Der Gehalt an freien Nukleotiden bei verschiedenen Funktionszuständen der Rattenleber

Rudolf Lang

1962

Der Gehalt an freien Nukleotiden bei verschiedenen Funktionszuständen der Rattenleber

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Rudolf Lang

aus

Mindelheim

Mai 1962

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Berichterstatter:

1) Privatdozent Dr. H. S c h ö n e n b e r g e r
2) Professor Dr. E. B a m a n n

Tag der mündlichen Prüfung: 25. 7. 62

Meinen lieben Eltern

Die vorliegende Arbeit ist in der Zeit von Januar 1960 bis Mai 1962 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie und am Pathologischen Institut der Universität München durchgeführt worden. Die Direktoren der beiden Institute, Herr Professor Dr. E. B a m a n n und Herr Professor Dr. W. B ü n g e l e r , haben mir die Einrichtung ihrer Institute zur Verfügung gestellt und damit die Durchführung der Untersuchungen ermöglicht. Dafür spreche ich meinen ergebensten Dank aus.

Die wissenschaftliche Leitung der Arbeit verdanke ich Herrn Privatdozenten Dr. H. S c h ö n e n b e r g e r , Herrn Professor Dr. E. B a m a n n und Herrn Privatdozenten Dr. med., Dr. rer. nat. H. W r b a . Bei chemischen Fragen wurde mir die besondere Unterstützung der beiden erstgenannten Herren zuteil, bei medizinisch-biologischen Problemen diejenige von Herrn Dr. W r b a .

Meine verehrten Lehrer versichere ich an dieser Stelle meines herzlichsten Dankes für die Förderung und Lenkung meiner Studien sowie für das Vertrauen und Wohlwollen, das sie mir in beruflichen und persönlichen Dingen stets entgegenbrachten.

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung 1

B. Die Befunde der Untersuchungen und deren Diskussion 5

C. Dokumentation der Ergebnisse 13

I) Der Gehalt an freien Nukleotiden in der normalen Rattenleber 13

II) Nukleotidgehalt im regenerierenden Leberparenchym der Ratte 44

III) Die Konzentration der Nukleotide in der Rattenleber im Verlaufe der Buttergelbfütterung 54

D. Experimenteller Teil 75

I) Methode der Ionenaustauschchromatographie . . 75

1) Vorbereitung der Säule 75

2) Bereitung des Extraktes 76

3) Elution 77

4) Rechromatographie 80

II) Routineanalysen 82

1) Spektralphotometrie 82

2) Phosphatbestimmung 84

3) Ribosebestimmung 86

4) Papierchromatographie 86

III) Einzelbestimmungen 90

1) DPN und TPN 90

2) UDPG und UDPGa 91

3) UDPA 92

4) UDPGl 93

E. Zusammenfassung 94

F. Anhang

I) Abkürzungen 95

II) Literaturverzeichnis 96

A. Einleitung

In den letzten Jahren haben Untersuchungen, die sich mit dem Studium der Nukleotidzusammensetzung von Geweben verschiedener Herkunft befassen, zunehmend an Bedeutung gewonnen. Der Grund hierfür liegt darin, daß das Zentrum des Intermediärstoffwechsels in den freien Nukleotiden zu suchen ist. Nukleotide spielen im Stoffwechsel nicht nur als Vorstufen der Nukleinsäuren eine Rolle. Viele niedermolekulare Verbindungen (Säuren, Alkohole, Zucker) werden für anschließende Biosynthesen aktiviert, indem sie Anhydride oder Ester mit Nukleotiden bilden. Diese Nukleotidderivate wirken als Überträger der mit ihnen verbundenen Reste. Häufig werden diese Reste chemisch abgewandelt während sie sich am Nukleotid befinden und erst dann in einer biosynthetischen Reaktion übertragen (63).

Es ist daher nicht verwunderlich, daß sich die Biochemie seit geraumer Zeit mit der qualitativen und quantitativen Analyse dieser am Stoffwechselgeschehen beteiligten Faktoren befaßt. Eine umfassende Trennung und Analyse aller in diese Vorgänge eingreifenden Nukleotide wurde aber erst mit der Einführung der Ionenaustauschchromatographie in das Gebiet der Nukleotidanalytik durch W.E. Cohn (10, 11) im Jahre 1950 und durch die Weiterentwicklung des Verfahrens durch W.E. Cohn und E.C. Carter (12) sowie durch R.B. Hurlbert, H. Schmitz, A.F. Brumm und V.R. Potter (24) möglich. R.B. Hurlbert und V.R. Potter (23) sowie H. Schmitz, R.B. Hurlbert und V.R. Potter (55) gelang mit Hilfe dieser Methode die Auffindung einer Reihe vordem unbekannter Nukleotide, die als charakteristischen Bestandteil andere Basen als Adenin enthalten.

Die systematische Anwendung der Ionenaustauschchromatographie bei säurelöslichen Extrakten verschiedener Gewebe (19, 31, 44, 45, 50, 51, 53, 54, 56) hat gezeigt, daß je nach der Funktion des Gewebes deutliche Unterschiede in deren Nukleotidverteilungsmuster zu erkennen sind (54). So läßt sich von Geweben,

bei denen energetische Transformationen im Vordergrund der Funktion stehen - wie bei Muskel und Herz - aussagen, daß sie durch ein massives Auftreten von Pyridin- und Adeninnukleotiden gekennzeichnet sind und daß diese etwa 90% des gesamten säurelöslichen Nukleosidphosphates ausmachen. Darüber hinaus liegen bei diesem Gewebetyp die Nukleotide vorwiegend in der energetischen Form, also als Triphosphate, vor. Gleichzeitig aber fällt der Mangel an Transportmetaboliten, wie UDPA, UDPG, UDPGa und UDPGl, auf.

Im Gegensatz dazu zeichnen sich die Gewebe , die vorwiegend dem Stoffwechsel dienen - wie Leber, Hirn und Milz - durch eine relative Einförmigkeit der Nukleotidverteilung aus. Neben den Nukleosidphosphaten des Adenins und den Pyridinnukleotiden, die hier im Gegensatz zum vorhin genannten Energietyp nur 55% der gesamten freien Nukleotide ausmachen, treten die Transportmetaboliten und die Phosphate des Guanosins, Cytidins und Uridins stark hervor.

Die Aufschlüsselung des Nukleotidverteilungsmusters ist aber nicht nur geeignet,verschiedene Gewebstypen zu klassifizieren, vielmehr findet diese Methode auch ihre Berechtigung bei der Untersuchung desselben Gewebes in verschiedenen Funktionszuständen. Bei der näheren Betrachtung eines Extinktionsbildes fallen etwaige Unterschiede zwischen einem Gewebe normalen und krankhaften Zustandes sofort auf. So konnte K. Papenberg (43, 44) mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie zeigen, daß die menschliche Leber bei Diabetes mellitus gegenüber dem Leberpunktat einer normalen menschlichen Leber durch eine Nukleotidverarmung gekennzeichnet ist und daß darüber hinaus TPNH, neben der generellen Verringerung aller Nukleotide, im Gehalt gesenkt ist. Auch zwischen alloxandiabetischer und normaler Rattenleber fand er ähnliche Verhältnisse. Im Gehirn von Ratten, die durch Gabe bestimmter Stoffe in einen Verkrampfungszustand versetzt wurden, konnten H. Coper, H. Herken und W. Koranskj (14) anhand des Säulenelutiogramms gegenüber normalen Rattenhirnen eine Verminderung an Di- und Triphosphaten des Adenosins, Guanosins und Uridins beobachten. E. Reid und B.M. Stevens (49) berichten über

eine, durch Ionenaustauschchromatographie ermittelte Abnahme des Gehaltes der Rattenleber an UMP, UDP, UTP, UDPGl und UDPG nach Adrenektomie. H. Schmitz, V.R. Potter, R.B. Hurlbert und D.M. White (56) haben bei der Aufschlüsselung des Nukleotidspektrums keine qualitativen Unterschiede im Nukleotidgehalt der Leber von normalen und tumortragenden Tieren finden können. Dagegen stellten die Autoren in weiteren Untersuchungen fest, daß der in diesen beiden Versuchsreihen mit ADX bezeichnete Gipfel im Elutiogramm von Tumoren, Skelettmuskel und Gehirn nicht auftritt. Bei der chromatographischen Auftrennung der Nukleotide eines im Uteruskorpus lokalisierten Carcinoms wies K. Papenberg (44) das Fehlen von TPN und TPNH als Ausdruck des glykolytischen Tumorstoffwechsels nach. Die qualitativen Untersuchungen von R. Daoust und A. Cantero (15) an Lebertumoren von Ratten nach 150tägiger Fütterung von 4-Dimethylaminoazobenzol haben ergeben, daß die in ähnlichen Diagrammen als UDPA, UDPG + UDPGa und UDPGl identifizierten Gipfel im Elutiogramm von Tumoren fehlen und daß zwei neue Guanosinderivate auftreten. Diese Ergebnisse konnten von E. Reid und F. Lotz (48) nicht bestätigt werden. Vielmehr vermuten sie, daß die Befunde von R. Daoust und A. Cantero auf eine unbefriedigende chromatographische Methode und einen postmortalen Abbau der labilen Nukleotide zurückzuführen sind. Die Autoren (48) fanden nämlich im Nukleotidgehalt von Lebertumoren nach Fütterung von 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol einen Anstieg von Uridindi- und -triphosphaten und einen Abfall des Gehaltes an UDPG und UDPGl sowie an Adenosinderivaten (ATP nicht mit einbezogen). In der "präcancerogenen" Rattenleber hingegen konnten E. Reid und F. Lotz nach 23tägiger Fütterung des Azokörpers bei UMP, UDPG und UDPGl eine Vermehrung sichern.

Eingehende quantitative Untersuchungen über eventuelle Änderungen des Gehaltes an freien Nukleotiden im Verlaufe von Cancerosierungsprozessen (48) und während der Regeneration der Rattenleber sind bisher nicht beschrieben worden.

Das Ziel der nachfolgenden Untersuchungen ist es, solche Abweichungen bei der durch Buttergelb geschädigten Rattenleber nach

30-, 60-, 100- und 150tägiger Einwirkung festzustellen und die dadurch bedingten Stoffwechselveränderungen zu beleuchten, die noch vor der Ausbildung eines histologisch nachweisbaren Lebertumors auftreten.

Weiterhin stellen wir uns die Aufgabe, den Gehalt an freien Nukleotiden der Rattenleber während der Regeneration, die durch partielle Hepatektomie ausgelöst wird, zu bestimmen und Vergleiche zwischen den drei Funktionszuständen - normale, regenerierende und p-Dimethylaminoazobenzol geschädigte Leber - anzustellen.

B. Die Befunde der Untersuchungen und deren Diskussion

In vergleichenden Untersuchungen über den Gehalt an freien Nukleotiden der Rattenleber im Normalzustand des Organs, während der Regeneration, die durch partielle Hepatektomie ausgelöst wird, und im Verlauf der Schädigung der Leber durch Buttergelb-Fütterung haben sich qualitative Unterschiede nicht ergeben. Dagegen konnten charakteristische Konzentrationsänderungen beobachtet werden (Tab. 1).

Die quantitative Bestimmung der freien Nukleotide in der Rattenleber verschiedener Funktionszustände zeigt besonders im Bereich der Adenosin-mono- und -triphosphate und der Pyridinnukleotide innerhalb der gleichen Versuchsreihe stark schwankende Werte, die in einigen Fällen eine sichere Aussage über die Abweichung vom Normalzustand des Organs nicht gestatten.

Die Ursache für diese Schwankungen ist wohl in erster Linie in der bei biologischen Versuchen allgemein zu beobachtenden Schwankungsbreite zu suchen. Daneben spielt bei der Gehaltsbestimmung der labilen Nukleotide aber auch die Entnahmetechnik der Gewebsproben und deren Aufarbeitung eine entscheidende Rolle. Bei unsachgemäßer Gewebsentnahme findet sehr rasch ein Abbau der energiereichen Verbindungen statt. Dies ist nicht verwunderlich wenn man sich den hohen Enzymgehalt der Leber und die ATPase-Konzentration des Blutes vergegenwärtigt. H.J. Hohorst, F.H. Kreutz und Th. Bücher (22) haben bei Untersuchungen des ATP-Gehaltes der Rattenleber je nach der Art des angewendeten Entnahmeverfahrens unterschiedliche Konzentrationen gefunden. Um höchste ATP-Werte zu erzielen, empfehlen W. Thorn und Mitarbeiter (64) das entfernte Organ direkt in gekühlte 1/3 molare Perchlorsäure zu werfen und sofort zu homogenisieren. A. Wollenberger und Mitarbeiter (66) beschreiben eine Kühlzange zur "in vivo Entnahme" von Gewebsexcisionen. Mit den in flüssiger Luft gekühlten Aluminium-Greifbacken dieser Zange wird der freie Leberrand gefaßt und das Gewebe nach erfolgter Keilexcision in flüssige Luft überführt.

Wegen der genannten Fehlerquellen lassen sich nur durch eine große Anzahl von Versuchsreihen reproduzierbare Werte erzielen. Die Aufwendigkeit des Verfahrens aber verbietet es - auch bei Vereinfachung der Methode (57, 58) - die wünschenswerte Zahl von Parallelversuchen durchzuführen.

Tabelle 1

Abweichungen der prozentualen Extinktionsanteile der isolierten Nukleotide verschieden behandelter Rattenlebern vom Normalwert, ausgedrückt in Prozent.

	Regenerierend	30 Tage DAB-Kost	60 Tage DAB-Kost	100 Tage DAB-Kost	150 Tage DAB-Kost
Summe der Adenosinphosphate	- 7,5	- 2,0	- 4,8	- 6,3	- 3,8
AMP	+ 8,9	-26,1	- 26,3	+ 11,8	- 15,1
ADP	- 4,1	+ 6,1	0,0	- 2,4	+ 1,1
ATP	-28,0	+13,4	+ 11,9	- 29,0	+ 2,1
Summe der Uracilverbindungen	+45,4	+14,2	+ 49,1	+ 41,1	+ 30,2
UMP	+88,0	+12,0	+ 51,3	+ 64,3	+ 21,0
UDP	+26,0	+18,2	+251,9	+ 27,3	+ 23,4
UDPA	+47,3	+ 7,3	+ 41,8	+ 18,5	+ 6,4
UDPG+UDPGa	+12,9	- 6,8	+ 2,6	+ 13,3	- 2,1
UDPGl	+56,3	+66,4	+105,2	+106,1	+144,1
Summe von DPN+TPN+ADPR+ADPRP	-10,3	+ 1,4	- 28,6	- 11,2	+ 13,0
DPN	-10,9	+ 2,1	- 42,1	- 31,5	+ 12,7
TPN	-31,8	-28,7	- 43,4	- 21,7	- 38,0
ADPR	+ 6,5	-16,7	- 35,2	+ 5,6	+ 22,2
ADPRP	-20,2	+ 8,7	- 5,5	- 3,2	- 0,9
CMP	+54,8	+33,9	+ 43,5	+ 38,7	+ 24,2
IMP	-36,2	+29,3	+ 55,2	+167,2	+ 48,3
GMP	+12,0	0,0	- 12,8	+ 27,8	+ 21,8
GDP	- 5,5	-11,0	- 28,8	- 21,6	- 5,9
GTP+UTP+X	-17,1	+ 6,9	+ 23,7	- 35,4	- 4,6

Obwohl unsere Ergebnisse im Falle der normalen Rattenleber nur auf 5, bei der über verschieden lange Zeiträume mit Buttergelb geschädigten Leber nur auf je 3 Versuchen mit 8 Tieren und beim regenerierenden Organ auf 4 Gruppen von je 16 hepatektomierten Ratten basieren, konnten wir doch in vielen Fällen mit Hilfe der statistischen Berechnungen signifikante Unterschiede der Rattenleber verschiedener Funktionszustände sichern.

Bei der regenerierenden Rattenleber ist, verglichen mit normalem Lebergewebe, die Summe der Adenosinphosphate signifikant verringert. Dies geht auf eine Abnahme des ATP-Gehaltes um 28% zurück, während AMP und ADP in der Größenordnung des Normalwertes liegen.

Eine Gegenüberstellung des prozentualen Anteils der Summe aller isolierten Uracilnukleotide von normalem und regenerierendem Leberparenchym zeigt bei diesem einen hochsignifikanten Anstieg um 45,4%. Die augenfälligsten Zuwachsraten in diesem Bereich erfahren das UMP mit 88%, UDPGl mit 56,3% und UDPA mit 47,3%, während sie bei UDP und UDPG + UDPGa nur 26% und 12,9% betragen.

Die Abnahme an oxydierten und reduzierten Pyridinnukleotiden um 10,3% im regenerierenden Gewebe ist gleichfalls sehr signifikant. Obwohl sich aus den eingangs erwähnten Gründen für die Einzelkomponenten DPN, TPN, ADPR und ADPRP - die beiden letzten sind Abbauprodukte des DPNH und TPNH - keine Signifikanz errechnen läßt, erscheint uns doch die Abnahme an TPN um 31,8%, DPN um 10,9% und ADPRP um 20,2% besonders markant (s.S. 52).

Signifikant hingegen ist die Vermehrung von CMP um 54,8%, sowie die Verringerung an IMP um 36,2%.

Im Falle der durch Buttergelb-Kost geschädigten Rattenleber haben wir zu unterscheiden zwischen 30-, 60-, 100- und 150 Tage lang mit dem Cancerogen behandelten Tieren.

Allen gemeinsam ist, daß die stärkste Abweichung im Nukleotidgehalt gegenüber den normalen Tieren nach 60 - 100tägiger Fütterung von 4-Dimethylaminoazobenzol auftritt und daß sich eine kontinuierliche Gehaltsänderung im Verlaufe der Behandlungsdauer

nicht abzeichnet.

In unseren Versuchsreihen mit über verschieden lange Zeiträume behandelten Ratten ist eine wenn auch unbedeutende Erniedrigung des Gehaltes an Adenosinphosphaten zu verzeichnen. Diese nur geringe Änderung hat ihren Grund darin, daß - wie aus Abbildung 27, Seite 65 zu ersehen ist - mit einer beachtlichen Verringerung des ATP-Gehaltes ein gleichzeitiger AMP-Anstieg einhergeht und umgekehrt.

Am deutlichsten treten die quantitativen Veränderungen des Gehaltes an löslichen Nukleotiden im geschädigten Organ bei den Uridinderivaten auf (s.S. 67 - 69). Die Summe aller isolierten Uracilnukleotide steigt nach 30 Tagen um 14,2%, nach 60 Tagen um 49,1%, nach 100 Tagen um 41,1% und nach 150 Tagen um 30,2% über die Norm. Diese Werte sind, ausgenommen der des 30Tage-Versuches, signifikant. Zurückzuführen ist diese Vermehrung vor allem auf den gewaltigen Anstieg des UMP, UDP, UDPA und UDPGl im geschädigten Organ, während UDPG + UDPGa im Bereich des Normalgehaltes liegt.

Die Pyridinnukleotide (s.S. 69) zeigen bei summarischer Betrachtung der Gehalte gegenüber dem normalen Gewebe vom 60. Tage der DAB-Behandlung an einen Abfall um 28,6%, der nach 100 Tagen nur noch 11,2% ausmacht. Nach 150 Tagen schließlich tritt eine hochsignifikante Vermehrung um 13% über den Normalwert auf. Im einzelnen ist bemerkenswert, daß DPN nach 60- bzw. 100tägiger Azodiät der Ratten um 42,1% bzw. 31,5% absinkt, dagegen nach 150 Tagen eine Erhöhung um 12,7% erfährt. TPN dagegen ist in allen Buttergelb-Versuchen verringert und zwar um 28,7%, 43,4%, 21,7% und 38% nach 30-, 60-, 100- und 150tägiger Einwirkungsdauer. ADPR, das Abbauprodukt des DPNH, ist nach 30- und 60tägiger Behandlung stark unter den Normalwert abgesunken, steigt aber im 100- und 150Tage-Versuch wieder über diesen an. ADPRP hingegen liegt in allen Buttergelb-Versuchen in der Grössenordnung des Normalwertes.

Bemerkenswert ist auch die Vermehrung des Gehaltes an CMP, das

im 60Tage-Versuch mit 43,5% sein Maximum erreicht und an IMP, welches nach 100 Tagen um 167,2% über dem Normalwert liegt.

Die wichtigsten quantitativen Unterschiede zwischen dem regenerierenden und dem mit Buttergelb behandelten Organ sind demnach einmal im Bereich der reduzierten Pyridinnukleotide zu suchen: ADPR entspricht in der regenerierenden Leber etwa dem Gehalt des normalen Gewebes, während es nach kurzer Azobehandlung der Ratten unter die Norm fällt. ADPRP hingegen ist im regenerierenden Gewebe stark vermindert, während es im mit Buttergelb geschädigten Organ nur unmerklich von der Norm abweicht.

Einen weiteren markanten Unterschied stellt der IMP-Gehalt dar. Im regenerierenden Gewebe ist er um 36,2% gegenüber normalen Tieren verringert, in allen Buttergelb-Versuchen dagegen charakteristisch vermehrt.

Wie aus Tabelle 1 zu erkennen ist, lassen sich auch bei den Adenosinphosphaten mit einigem Vorbehalt Unterschiede im Nukleotidgehalt der beiden Gewebstypen angeben. Während im regenerierenden Organ, verglichen mit der normalen Leber, AMP um 8,9% zunimmt, ATP dagegen um 28% verringert ist, weicht der Gehalt an diesen beiden Stoffen nach 30-, 60- und 150tägiger Cancerogenbehandlung der Leber gerade im umgekehrten Sinne von der Norm ab.

Die quantitativen Veränderungen der übrigen Nukleotide von regenerierender und mit Buttergelb behandelter Rattenleber liegen gegenüber der Norm in der gleichen Richtung.

Eine Deutung der unterschiedlichen Nukleotidgehalte der Rattenleber verschiedener Funktionszustände ergibt sich aus der Funktion der Nukleotide als präformierte Bausteine der Nukleinsäuresynthese, als Transportmetaboliten und als Cofermente.

Die Uridinnukleotide nehmen im Stoffwechsel an Transglykosidierungen teil und wirken als Coenzym bei der Umwandlung eines Zuckers in ein anderes Kohlenhydrat (63).

Augenfällig ist daher die Gehaltsvermehrung an UDPGl im Falle

der regenerierenden und der mit Buttergelb behandelten Leber. Diese Steigerung ist durch die beiden Funktionen erklärbar, die dieses Coenzym in der Zelle ausübt. UDPGl dient einerseits zum Aufbau von Mucopolysacchariden und andererseits zur Entgiftung durch Glukuronidbildung. Die Mucopolysaccharide kommen als Gerüstsubstanzen des Bindegewebes und als Schleimsubstanzen im Körper vor und werden aus Uronsäuren und acetylierten Aminozukkern gebildet. Ihre Synthese verläuft in der Zelle vermutlich über die aktivierten Zwischenprodukte UDPGl und UDPA (6, 62).

Der Anstieg an UDPGl bei den mit Buttergelb geschädigten Geweben, in denen histologisch Cirrhosen nachzuweisen sind, ist aufgrund der damit verbundenen Bindegewebswucherung zu verstehen. Auch die Vermehrung des UDPA-Gehaltes ist aus diesem Grunde einzusehen. Die starke Zuwachsrate des UDPGl-Gehaltes bei der mit Buttergelb behandelten Rattenleber kann damit erklärt werden, daß hier Glukuronsäure auch zur Entgiftung der DAB-Abbauprodukte o- und p-Aminophenol in erheblichem Maße gebraucht wird. Nach G.I. Dutton und I.D.E. Storey (18) wird in Leberhomogenaten aus o-Aminophenol o-Aminophenylglucuronid gebildet.

Wie bereits erwähnt, ergab die quantitative Bestimmung von UDPG + UDPGa im Gegensatz zu allen anderen Uridinverbindungen bei den mit DAB-Kost behandelten Tieren keinen markanten Anstieg, obwohl die gesteigerten Transglykosidierungsprozesse eine Vermehrung erwarten ließen. Unser Befund kann durch die Beobachtungen anderer Autoren (21, 40, 41, 61) erklärt werden, die ein Nachlassen des damit im Zusammenhang stehenden Glykogenbildungsvermögens schon im präcancerösen Zustand sowohl histologisch wie chemisch feststellen konnten.

Die Gehaltszunahme an UDP hängt vermutlich mit einer gesteigerten RNS-Synthese und mit erhöhten Transglykosidierungsvorgängen zusammen. UDP ist die direkte Vorstufe der Polynukleotide. Andererseits wird UDP auch bei der gesteigerten Glucuronidbildung frei (62).

Die signifikante Zunahme an UMP im Falle der regenerierenden und geschädigten Leber steht nicht nur in Zusammenhang mit den

eben geschilderten Vorgängen, sondern erklärt darüber hinaus eine Synthesezunahme der Cytidinderivate (32). Tatsächlich konnten wir in den Versuchen mit regenerierender und mit DAB behandelter Leber einen gesteigerten CMP-Gehalt feststellen der seinerseits auf eine vermehrte Phosphatidbiosynthese hinweist. CMP wird beispielsweise bei der Übertragung des Cholinrestes von Cytidindiphosphocholin auf Akzeptormoleküle, z.B. Diglyzeride, frei (26, 27, 28, 65). CMP, das bei allen Buttergelb-Versuchen eine beachtliche Vermehrung im Vergleich zu unbehandelter Leber erfährt, kommt nach E. Chargaff (9) in der RNS des menschlichen Lebertumors vermehrt vor.

Bei den Purinnukleotiden zeigt sich im Falle des Gehaltes an IMP ein deutlicher Unterschied zwischen der regenerierenden und der mit Buttergelb geschädigten Leber. Während im regenerierenden Organ der IMP-Gehalt signifikant unter der Norm liegt, ist er im geschädigten Organ stark vermehrt. Dies deutet im ersteren Falle auf eine verminderte, im anderen Falle aber auf eine gesteigerte Adenin- und Guaninsynthese hin (1, 33). Für die regenerierende Leber konnten wir dies in unseren Untersuchungen bestätigen. Im geschädigten Organ dagegen fanden wir im Bereich der Adenosinphosphate gleichfalls eine unerklärliche Verringerung, während die Guanosinphosphate in Abhängigkeit von der Dauer der Cancerogeneinwirkung über oder unter dem Normalwert liegen.

Unsere Befunde bezüglich der oxydierten Pyridinnukleotide stimmen mit den Ergebnissen von C.J. Kensler und Mitarbeitern (29) überein, die in der präcancerösen Leber eine starke DPN-Abnahme fanden. Es liegt nahe, daß in beiden Funktionszuständen eine Senkung im Gehalt an Pyridinnukleotiden mit der Funktion stofflicher Synthese zusammenhängt. Dabei ist nur im Falle der regenerierenden Leber eine entsprechende Volumenzunahme des Organs nachweisbar. Auch beim embryonalen Wachstum ist der Gehalt an diesen Verbindungen gering. Er nimmt im Zuge der Entwicklung zu (4, 5). Erstaunlich ist unser Versuchsbefund nach 150tägiger Behandlung mit DAB. Es ergibt sich nämlich jetzt eine signifikante Erhöhung des DPN-Gehaltes über den Normalwert. Der der Berech-

nung zugrunde liegende Wert wurde aus 3 Versuchsreihen mit je 8 Tieren ermittelt, von denen nur etwa ein Drittel Carcinome aufweisen. Nach Arbeiten von C. Carruthers (8), G.E. Glock (20) und L.A. Jedeikin (25) müßte aber gerade hier bei der malignen Entartung eine Erniedrigung des DPN-Gehaltes gefunden werden. Es scheint daher zweckmäßig, dieses Ergebnis in weiteren Untersuchungen einer eingehenden Prüfung zu unterziehen.

C. Dokumentation der Ergebnisse

I) Der Gehalt an freien Nukleotiden in der normalen Rattenleber

Ausgangspunkt unserer Versuche war die Aufschlüsselung des Nukleotidverteilungsmusters der normalen Rattenleber. In 5 gleichartigen Versuchen haben wir jeweils 48 g Frischleber, die von 8 Ratten gewonnen wurden, untersucht. Die Herstellung des sauren Nukleotidextraktes und dessen Aufarbeitung erfolgte mit der auf den Seiten 76 - 80 beschriebenen Methode von R.B. Hurlbert und Mitarbeitern (24). Die bei diesen 5 Versuchen erhaltenen Kurven zeigen in ihrem Verlauf eine weitgehende Übereinstimmung. Abbildung 1 zeigt das Kurvenbild für Versuch B dieser Versuchsreihe.

Auf der Abszisse ist die Anzahl der Fraktionen, auf der Ordinate sind die Extinktionen bei 260 mμ wiedergegeben. Die zweite, schräg verlaufende Grundlinie stellt die Extinktion des Elutionsmittels dar. Die über dem Diagramm befindliche Kurve ergibt sich aus den Extinktionsquotienten $\frac{E\ 275}{E\ 260}$ der einzelnen Fraktionen und ermöglicht erste Hinweise auf die Zusammensetzung der jeweiligen Gipfel. Wie der Kurvenverlauf des Hauptchromatogramms zeigt, konnte hier eine vollkommene Trennung in reine Nukleotide noch nicht erreicht werden. Jedoch läßt Abbildung 1 bereits eine Aufgliederung in eine Anzahl von Gruppen erkennen, die jeweils aus mehreren Nukleotiden ähnlichen chromatographischen Verhaltens in Ameisensäure zusammengesetzt sind. Die einzelnen Fraktionen der unter Berücksichtigung der Extinktionskurve bei 260 mμ und der Quotientenkurve $\frac{E\ 275}{E\ 260}$ zusammengefaßten Abschnitte (in den Abb. 1, 23 und 26 mit I - X bezeichnet) wurden vereinigt und durch Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit. Die so erhaltenen Rückstände adsorbierten wir erneut an einen Anionenaustauscher. In den nun folgenden Rechromatogrammen (mit R_1 - R_{10} bezeichnet) wird mit Ammoniumformiat in steigender Konzentration eluiert. Da die einzelnen Nukleotide relativ zueinander eine unterschiedliche Ladung in Säure und Pufferlösung aufweisen, ergibt sich daraus eine veränderte Position dieser Stoffe

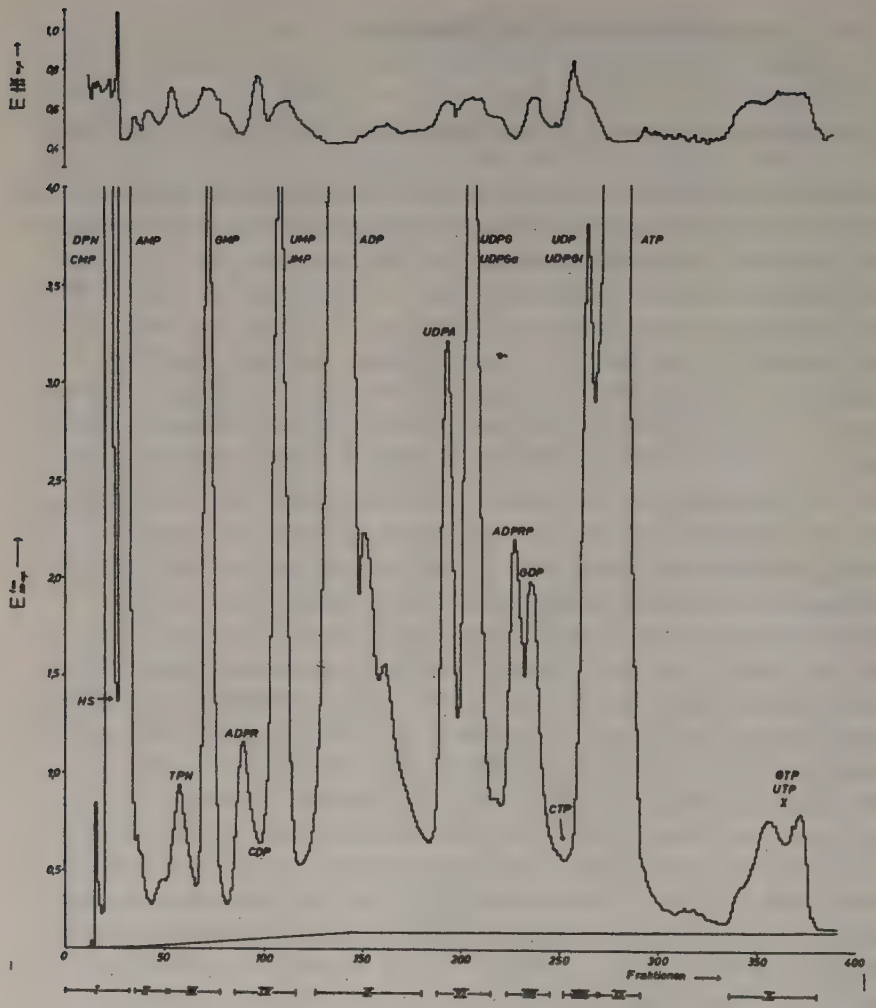


Abbildung 1 : Normale Rattenleber. Hauptchromatogramm des Versuchs B.

Säule : 32 x 1 cm
Mischflasche : 500 ml H_2O
Reservoir : 0 -125 4 n HCOOH
126-205 4 M HCOOH + 0,2 M $HCOONH_4$ / 1 H_2O
206-285 4 M HCOOH + 0,4 M $HCOONH_4$ / 1 H_2O
286-Ende 4 M HCOOH + 0,8 M $HCOONH_4$ / 1 H_2O

gegenüber dem Hauptchromatogramm. Eine Kombination dieser beiden Elutionssysteme ermöglicht daher eine weitgehende Abtrennung der einzelnen Nukleotide.

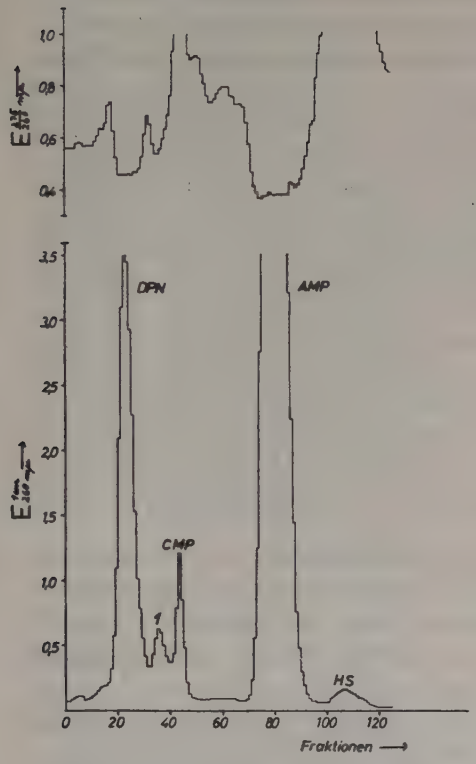


Abbildung 2: Rechromatogramm R_1 des Abschnitts I des Hauptchromatogramms.
Säule: 27 x 0,8 cm
Mischflasche: 500 ml H_2O
Reservoir: 1n $HCOONH_4$

Die Rechromatographie des ersten Abschnitts des Hauptchromatogramms umfaßt die Fraktionen 0 - 34. Abbildung 2 des Rechromatogramms R_1 zeigt eine deutliche Aufgliederung in 5 Gipfel, von denen nur der mit Nummer 1 bezeichnete nicht näher untersucht wurde. Die Fraktionen der übrigen in der Abbildung beschrifteten peaks wurden entsprechend ihrem einheitlichen spektralphotometrischen Quotienten $\frac{E\ 275}{E\ 260}$ vereinigt und durch Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit. Den Rückstand untersuchten wir zunächst im sauren (pH 2) und alkalischen (pH 12) Milieu spektralphotometrisch. Von erstmalig isolierten Verbindungen haben wir UV-Spektren im Bereich 220 - 290 mμ aufgenommen. In den Parallelversuchen benützten wir zur Charakterisierung der Verbindungen die Quotienten zweier Wellenlängen sowie Maximum und Minimum der

Extinktionskurve (s. Tab. 2, Seite 20). Zur Berechnung der Konzentration verwenden wir folgende millimolare Extinktionskoeffizienten: Uridin 9,9; Cytidin 13,7; Adenosin 14,1; Guanosin 13,3 und Inosin 13,2. Nach der Untersuchung des Nukleosidgehaltes erfolgt die quantitative Bestimmung des Gesamtphosphates, des labilen Phosphates und des anorganischen Phosphates der vorliegenden Verbindung, sowie die Ermittlung des Gehaltes an Ribose, da sich nach Abrechnung des anorganischen Phosphates aus dem Mol-Verhältnis Base:Ribose:labiles Phosphat:Gesamtphosphat auf die Zusammensetzung der Substanz schließen läßt. Die hierbei gefundenen Werte sind in Tabelle 2 auf Seite 20 zusammengetragen. Aus diesen Werten ergibt sich, daß die Fraktionen 21 - 26 DPN, 43 - 46 CMP, 75 - 86 AMP und 104 - 112 HS enthalten. Weiterhin untersuchen wir die isolierten Stoffe gleichzeitig in den Systemen Ammonsulfat-Phosphatpufferlösung-Propanol (System I) und Isobuttersäure-Ammoniak-Wasser (System II) papierchromatographisch. Die durch Hydrolyse freigesetzten Basen der Verbindungen werden in dem System tert. Butanol-Salzsäure-Wasser (System IV) ebenfalls chromatographiert. Die R_F-Werte der authentischen Verbindungen in diesen drei Systemen sind in den Tabellen 25 und 27 auf den Seiten 87 und 89 zusammengestellt.

Abbildung 3: Photoprintkopie des in System I angefertigten Papierchromatogramms der isolierten Fraktionen von R_1 und der Vergleichssubstanzen.

Abbildung 3 zeigt die Photoprintkopie der in System I papierchromatographisch untersuchten Verbindungen des Rechromatogramms R_1. Auch die Systeme II und IV bestätigen, wie System I, die Identität der analysierten Verbindungen mit den Ver-

gleichssubstanzen. Doch läßt sich für den Gipfel 1 keine Substanz finden, die in allen drei Systemen den gleichen R_F-Wert aufweisen würde wie dieser.

DPN wurde neben den bereits erwähnten Analysen auch durch das charakteristische Spektrum in Kaliumcyanidlösung identifiziert (13). Zur quantitativen Bestimmung des DPN und gleichzeitig zur Bestätigung der Exaktheit der vorher beschriebenen quantitativen Analyse benützen wir die von G. Michal und W. Lamprecht (38) ausgearbeitete enzymatische Methode (s.S. 90).

Die Identität der Fraktionen 104 - 112 mit Harnsäure ist weitgehend gesichert. Die Lage des Stoffes im Rechromatogramm steht im Gegensatz zu den Befunden von R.B. Hurlbert, H. Schmitz, A.F. Brumm und V.R. Potter (24) und H. Schmitz (52), welche die Harnsäure vor dem AMP-Gipfel lokalisierten. Das Vorliegen von Harnsäure in den Fraktionen 104 - 112 ergibt sich aus dem charakteristisch hohen Quotienten (um 1,9) und dem Fehlen von Phosphat und Ribose. Auch die Papierchromatographie weist trotz der Schwanzbildung auf die Identität mit Harnsäure hin. Zur weiteren Festigung unserer Ergebnisse fertigten wir mit authentischer Harnsäure und AMP ein Vergleichselutiogramm an, wobei wir auch hier AMP in den Fraktionen 70 - 90 und Harnsäure in den Gefäßen 100 - 120 nachweisen konnten.

Abbildung 4 zeigt das Rechromatogramm der Gefäße 35 - 51 des Hauptchromatogramms. Von den beiden deutlich hervortretenden Gipfeln konnte mit den oben genannten Methoden der Base-, Phosphat- und Ribosebestimmung nur der nach der Lyophilisierung der Fraktionen 70 - 79 verbleibende Rückstand eindeutig als AMP identifiziert werden. Dieses stammt zweifellos aus den letzten Fraktionen des im Hauptchromatogramm mit AMP bezeichneten Gipfels. Von der in Abbildung 4 mit Nummer 2 bezeichneten Komponente ist wegen der geringen Menge keine befriedigende Basen-, Phosphat- und Ribosebestimmung möglich gewesen. Die Lage der beiden Stoffe im Papierchromatogramm in System I ist in Abbildung 5 wiedergegeben.

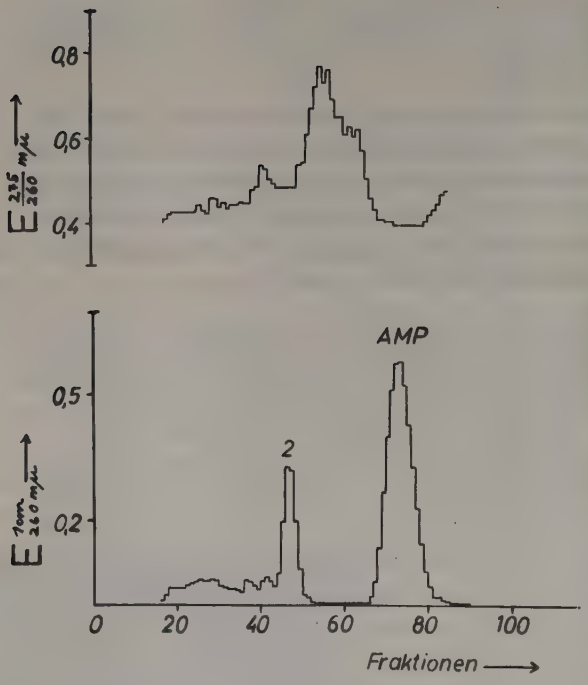


Abbildung 4: Rechromatogramm R_2 des Abschnitts II des Hauptchromatogramms.
Säule: 24,5 x 0,8 cm
Mischflasche: 500 ml H_2O
Reservoir: 1n $HCOONH_4$

Abbildung 5: Photoprintkopie des in System I angefertigten Papierchromatogramms der isolierten Fraktionen von R_2 und der Vergleichssubstanz

R_3 der Fraktionen 52 - 78 des Hauptchromatogramms ist in Abbildung 6 dargestellt. Die Hauptmenge der hier anfallenden Reinsubstanz ist GMP, wie die Basen-, Phosphat- und Riboseanalyse beweist (s. Tab. 2, S.20). Auch die Papierchromatographie dieses Nukleotids in den Systemen I und II ergibt ebenso wie die Chromatographie der Base in System IV die Identität mit Guanosinmonophosphat. Der andere hervorstechende Gipfel der Fraktionen 50 - 55 des R_3 ist TPN, wie die in Tabelle 2 aufgeführten Werte zeigen. Darüber hinaus kann die Identität dieser Fraktionen mit TPN

auch durch das charakteristische Spektrum in Kaliumcyanidlösung bewiesen werden (13). Des weiteren bestätigt der enzymatische Test nach G. Michal und W. Lamprecht (38) unsere Befunde.

Abbildung 7 - ein Photoprintabdruck - belegt die Identität der Stoffe.

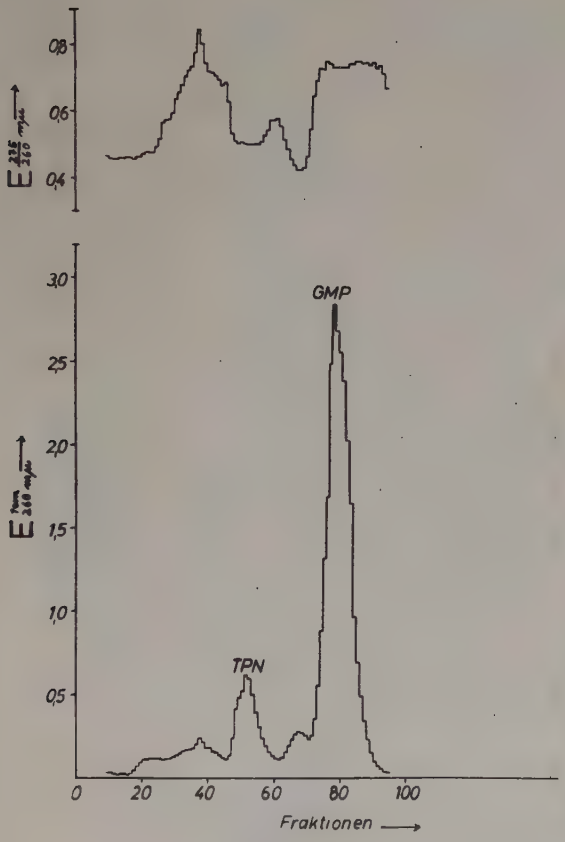


Abbildung 6: Rechromatogramm R_3 des Abschnitts III des Hauptchromatogramms.
Säule: 26 x 0,8 cm
Mischflasche: 500 ml H_2O
Reservoir: 1n $HCOONH_4$

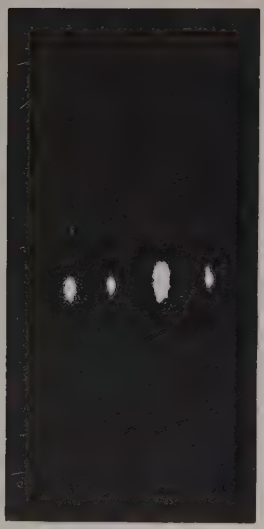


Abbildung 7: Photoprintkopie des in System I angefertigten Papierchromatogramms der isolierten Fraktionen von R_3 und der Vergleichssubstanzen.

Tabelle 2

Auswertung der Rechromatogramme R_1-R_5

Rechromatogramm	Fraktionen	λmax pH 2	λmin pH 2	λmax pH 12	λmin pH 12	E bei gegebener Wellenlänge: E im Maximum bei pH 2 — min	230	245	260	275	E 280 / E 260	E 250 / E 260	Ribose / Base	labil. PO_4 / Base	Gesamt PO_4 / Base	Papierchr. identisch in System	weitere Analysen	Identität
R_1	21-26	258	232	259	230	0.47	0.49	0.69	0.99	0.50	0.24	0.84	1.30	0.30	2.10	I, II	s.S.90	DPN
R_1	43-46	278	241	270	250	0.14	0.30	0.17	0.53	0.97	1.87	0.48		0	1.08	I, II, IV		CMP
R_1	75-86	257	231	260	230	0.26	0.27	0.64	0.98	0.41	0.22	0.85	1.00	0	1.02	I, II, IV		AMP
R_1	104-112	283	254	295	261	0.43	0.85	0.58	0.48	0.87	2.04	0.93	0	0	0	I, II		HS
R_2	46-49	256	235	256	245	0.54		0.72	0.87	0.36	0.29	1.03				I, II, IV		?
R_2	70-79	256	230	259	230	0.24	0.24	0.63	0.97	0.41	0.22	0.85	0.91	0	0.95	I, II, IV		AMP
R_3	50-55	257	231	260	231	0.41	0.42	0.68	0.99	0.47	0.24	0.84				I, II, IV	s.S.90	TPN
R_3	77-85	256	228	264	232	0.23	0.27	0.74	0.96	0.67	0.67	1.00	1.00	0	0.92	I, II, IV		GMP
R_4	46-50	260	230	261	241	0.21	0.21	0.58	1.00	0.57	0.31	0.77	1.06	0	0.95	I-IV		UMP
R_4	60-63	250	222	253	224	0.22	0.38	0.94	0.71	0.20	0.13	1.41	1.12	0	1.15	I, II		IMP
R_4	73-79	279	240	272	251	0.12	0.28	0.17	0.53	0.97	1.80	0.47		0.97	2.10	I, II		CDP
R_4	120-128	258	228	261	231	0.25	0.28	0.63	0.99	0.40	0.22	0.84	1.60	0.93	1.91	I, II, IV		ADPR
R_5	44-46 (Base)	262	229	269	236	0.33	0.34	0.63	0.99	0.60	0.36	0.75	0	0	0	IV		Adenin

Fortsetzung von Tabelle 2

Auswertung der Rechromatogramme R_5-R_7

Rechromatogramm	Fraktionen	λmax pH 2	λmin pH 2	λmax pH 12	λmin pH 12	E bei gegebener Wellenlänge / E im Maximum bei pH 2					E 280 / E 260	E 250 / E 260	Ribose / Base	labil. PO_4 / Base	Gesamt PO_4 / Base	Papierchr. identisch in System	weitere Analysen	Identität
						min	230	245	260	275								
R_5	52-56 (Base)	263	229	267	237	0.32	0.34	0.62	0.98	0.60	0.37	0.76	0	0	0	IV		Adenin
R_5	65-72	258	231	260	231	0.23	0.24	0.64	0.98	0.42	0.22	0.84	1.00	0	1.00	I, II, IV		AMP
R_5	91-106	257	230	260	230	0.22	0.22	0.64	0.98	0.40	0.22	0.84	1.18	1.00	2.00	I, II, IV		ADP
R_5	120-128	266	233	266	234	0.27	0.29	0.48	0.96	0.86	0.66	0.69				I, II, IV		
R_6	37-39	260	230	261	241	0.21	0.21	0.58	1.00	0.57	0.31	0.77	0.98	0	1.12	I-IV		UMP
R_6	43-47	261	230	260	243	0.24	0.24	0.57	0.99	0.61	0.35	0.75	1.05	0.98	1.96	I-IV	s.S.92	UDPA
R_6	52-60	262	230	260	244	0.27	0.27	0.58	0.99	0.61	0.37	0.77	1.15	0.98	1.95	I-IV	s.S.91	UDPG UDPGa
R_6	65-68	261	231	261	242	0.23	0.23	0.55	0.99	0.60	0.34	0.74	1.06	1.00	2.00	I-IV		UDP
R_7	69-72	256	228	265	231	0.24	0.25	0.73	0.96	0.69	0.68	1.01	1.00	0	1.00	I, II, IV		GMP
R_7	93-96	258	230	260	230	0.23	0.23	0.65	0.99	0.42	0.22	0.84	1.00	0.20	2.10	I, II, IV		ADP2'5'
R_7	103-106	256	228	265	231	0.22	0.23	0.73	0.96	0.69	0.68	1.01	1.00	0.91	2.00	I, II, IV		GDP
R_7	118-123	257	230	260	230	0.23	0.23	0.64	0.98	0.40	0.22	0.84	1.80	1.02	2.70	I, II, IV		ADPRP

Fortsetzung von Tabelle 2

Auswertung der Rechromatogramme R_8-R_{10}

Rechromatogramm	Fraktionen	λmax pH 2	λmin pH 2	λmax pH 12	λmin pH 12	E bei gegebener Wellenlänge / E im Maximum bei pH 2					E 280 / E 260	E 250 / E 260	Ribose / Base	labil. PO_4 / Base	Gesamt PO_4 / Base	Papierchr. identisch in System	weitere Analysen	Identität
						min	230	245	260	275								
R_8	41-43	260	230	261	241	0.21	0.21	0.58	1.00	0.57	0.31	0.77	0.98	0	1.08	I-IV		UMP
R_8	69-73	261	231	261	242	0.22	0.22	0.56	0.99	0.61	0.35	0.74	1.00	1.00	2.05	I-IV		UDP
R_8	104-115	262	232	259	246	0.30	0.32	0.59	0.99	0.61	0.38	0.78	1.16	0.91	1.80	I-IV	s.S.93	UDPGl
R_9	48-53	258	228	260	230	0.21	0.24	0.63	0.98	0.40	0.23	0.85	1.00	0	0.98	I, II, IV		AMP
R_9	80-85	257	228	261	230	0.21	0.23	0.63	0.97	0.40	0.23	0.84	0.95	0.90	1.84	I, II, IV		ADP
R_9	104-114	258	230	260	228	0.24	0.24	0.63	0.98	0.41	0.22	0.84	1.00	2.05	3.10	I, II, IV		ATP
R_{10}	31-35	260	231	261	241	0.21	0.21	0.57	0.99	0.57	0.31	0.77	0.98	0	1.00	I-IV		UMP
R_{10}	55-59	261	231	261	241	0.23	0.23	0.55	1.00	0.58	0.34	0.74	1.21	0.92	1.84	I-IV		UDP
R_{10}	64-69	256	228	264	232	0.21	0.25	0.74	0.97	0.67	0.67	1.01	0.95	0	0.97	I, II, IV		GMP
R_{10}	76-80	257	230	260	230	0.22	0.22	0.64	0.98	0.40	0.22	0.84	1.10	0.90	1.85	I, II, IV		ADP
R_{10}	90-108	256	228	264	232	0.21	0.26	0.74	0.96	0.70	0.68	1.01	0.88	0.98	2.21	I, II, IV		GDP
R_{10}	90-108	260	230	261	241	0.21	0.21	0.58	1.00	0.57	0.31	0.78	1.18	2.10	3.15	I-IV		UTP

Als nächstes unterziehen wir die Fraktionen 85 - 116 des ersten Elutiogramms der Rechromatographie (Abb. 8). R_4 ist beherrscht durch einen mächtigen Gipfel zwischen den Fraktionen 46 - 50. Die Analysen für Base, Ribose und Phosphat sowie die Papierchromatographie in den Systemen I, II und IV ergeben eindeutig UMP. UMP wird außerdem noch in System III (Ammoniumacetatpuffer-Äthanol) papierchromatographisch identifiziert. Die Fraktionen 60 - 63 enthalten IMP. Dafür sprechen die in Tabelle 2 aufgeführten Werte. Auch das Papierchromatogramm in System I und II bestätigte diesen Befund. Bei den Fraktionen 73 - 79 handelt es sich um CDP, das durch erhebliche Mengen an AMP verunreinigt ist. Die papierchromatographische Untersuchung zeigt deutlich 2 voneinander getrennte Flecken, von denen der der

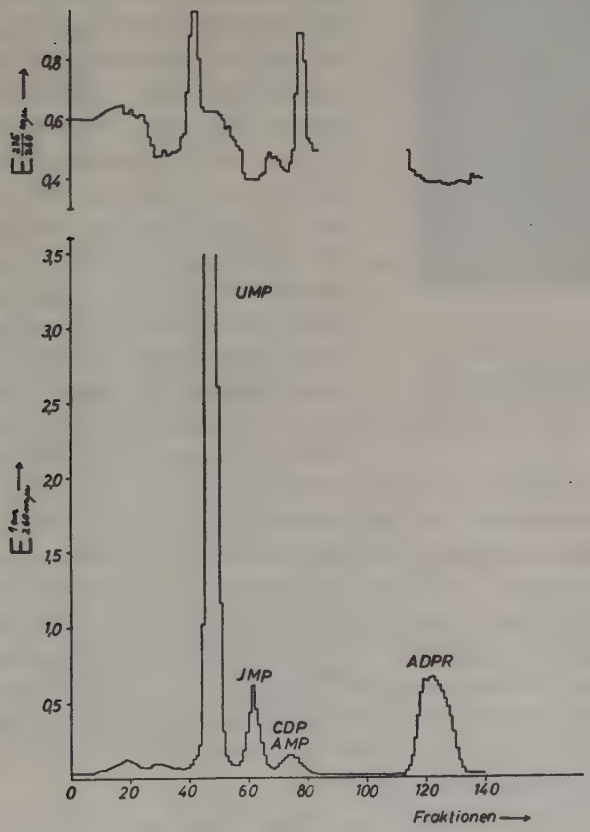


Abbildung 8: Rechromatogramm R_4 des Abschnitts IV des Hauptchromatogramms.
Säule: 25 x 0,8 cm
Mischflasche: 500 ml H_2O
Reservoir: 1n $HCOONH_4$

Abbildung 9: Photoprintkopie des in System I angefertigten Papierchromatogramms der isolierten Fraktionen von R_4 und der Vergleichssubstanzen.

Lösungsmittelfront nächstliegende mit CMP, der andere mit AMP identisch ist.

In Tabelle 2 sind die Werte aufgeführt, die wir nach der papierchromatographischen Trennung für CDP erhielten. Die Verunreinigung ist anscheinend auf ein bei der Gefriertrocknung entstandenes Zersetzungsprodukt des ADPR, des letzten Gipfels in R_4, zurückzuführen. Eine kleine Menge des im Verlauf der Aufarbeitung gespaltenen CDP konnte als CMP in den Fraktionen 41 - 44 aufgrund des hohen Quotienten und der Lage im Elutiogramm wahrscheinlich gemacht werden. Die Fraktionen 120 - 128 konnten wir als ADPR identifizieren. Die Bestimmung der Relation Base:Ribose:Phosphat erbrachte die Werte 1:1,6:1,9. Diese Abweichung erklären wir uns durch eine leichte Zersetzung in ADP bei der vorangehenden Lyophilisierung. Ein Vergleichschromatogramm an Dowex 1 mit ADP und ADPR der Firma Pabst Laboratories bestätigte die Richtigkeit der Position von ADPR und zeigte außerdem eine weitgehende Überlappung der beiden Substanzen. Auch die Papierchromatographie des letzten peaks in den Systemen I und II ermöglichte keine deutliche Abtrennung von ADP, da beide Stoffe in beiden Systemen etwa die gleichen R_F-Werte besitzen (s. Tab. 25, S. 87).

Nach K. Papenberg (43) entsteht das ADPR durch den perchlorsauren Aufschluß des Lebergewebes aus DPNH. Ganz analog wird auch das TPNH durch diese Behandlung in ADPRP gespalten. Durch einen Modellversuch mit DPN, TPN, DPNH und TPNH konnten wir die Ergebnisse von K. Papenberg bestätigen. Die aufgeführten Substanzen

wurden der gleichen Behandlung wie das Lebergewebe bei der Herstellung des Nukleotidextraktes unterworfen und an einen Anionenaustauscher Dowex 1 adsorbiert. Darauf wurde wie im Hauptchromatogramm eluiert. Im Eluat konnten dann die Stoffe DPN, TPN, ADPR und ADPRP gefunden werden (s. Abb. 10).

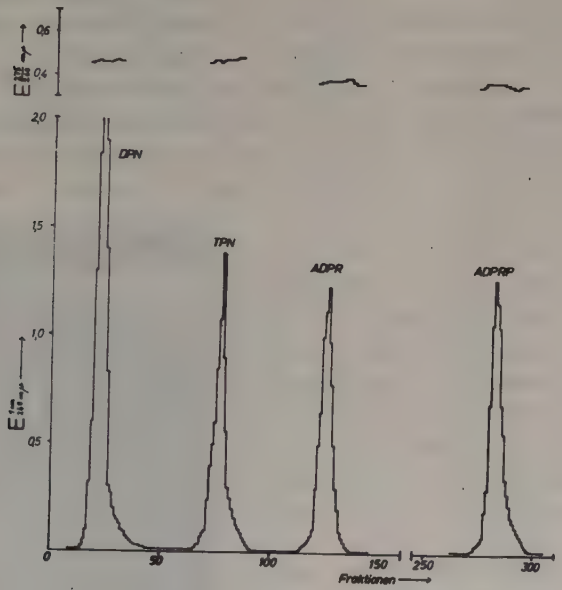


Abbildung 10: Elutiogramm der Substanzen DPN, TPN, DPNH und TPNH nach Behandlung mit Perchlorsäure.
Säule: 31 x 1 cm
Mischflasche: 500 ml H_2O
Reservoir: 0 - 125 4n HCOOH
126 - 205 4M HCOOH+0,2M $HCOONH_4$/l H_2O
206 - 285 4M HCOOH+0,4M $HCOONH_4$/l H_2O
286 - 320 4M HCOOH+0,8M $HCOONH_4$/l H_2O

In der Abbildung 11 ist das Rechromatogramm der Fraktionen 126 - 180 des Hauptchromatogramms wiedergegeben. Schon der Quotient $\frac{E\ 275}{E\ 260}$ mμ ≈ 0,4 der beiden mächtigen Gipfel dieses Diagramms

weist auf Adeninderivate hin. Die spektralphotometrische Bestimmung und die papierchromatographische Untersuchung der Base bestätigte unsere Vermutung. Eine anschließende Bestimmung des Verhältnisses Base: Ribose:Phosphat ergab für die Fraktionen 65 - 72 das Verhältnis 1:1:1 und für die Fraktionen 91 - 106 1:1:2. Es kann sich also nur um AMP und ADP handeln, was die

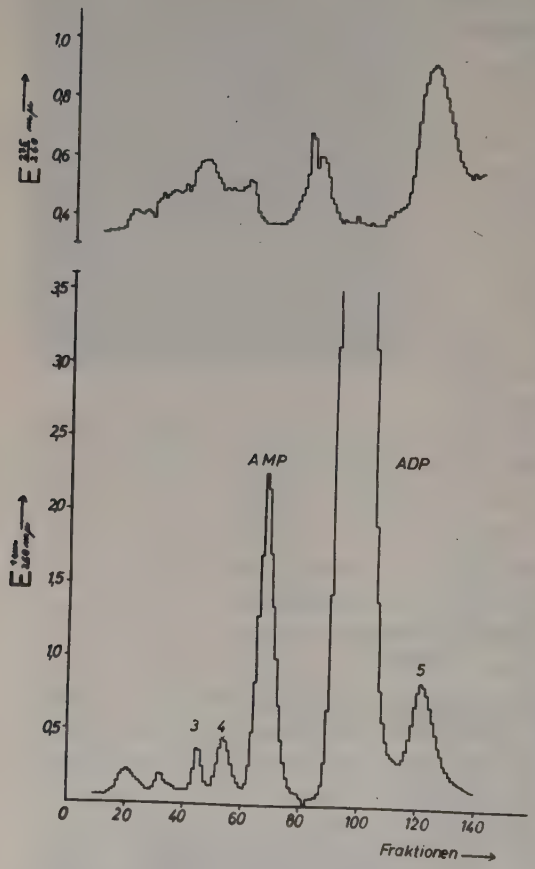


Abbildung 11: Rechromatogramm R_5 des Abschnitts V des Hauptchromatogramms.
Säule: 25 x 1 cm
Mischflasche: 400 ml H_2O
Reservoir: 0 - 80 1n $HCOONH_4$
81 - Ende 2n $HCOONH_4$

Abbildung 12: Photoprintkopie des in System II angefertigten Papierchromatogramms der isolierten Fraktionen von R_5 und der Vergleichssubstanzen.

Papierchromatographie der beiden Stoffe in den Systemen I und II sicherte (s. Abb. 12). Das in R_5 auftretende AMP muß als Spaltprodukt des ADP gewertet werden, da ja in den hier untersuchten Fraktionen des Hauptchromatogramms AMP nicht auftreten kann.

Die mit den Nummern 3, 4 und 5 bezeichneten Gipfel konnten nicht identifiziert werden und stammen aus den auf ADP folgenden Fraktionen 149 - 180 des Hauptchromatogramms. Von H.Schmitz (52) werden diese Fraktionen zur FAD-Gruppe gerechnet. Unsere spektralphotometrischen Untersuchungen ergaben aber nicht die für FAD charakteristische Absorption im Bereich 350 - 470 mμ. Jedoch konnten wir aus den Gipfeln 3, 4 und 5 durch Hydrolyse eine Base freisetzen, die die für Adenin geforderten UV-Charakteristika besitzt und außerdem im System IV mit Adenin übereinstimmt. Die Papierchromatographie von reinem FAD in 5%iger Na_2HPO_4-Lösung ergab weder mit den vereinigten Fraktionen 149 - 180 des Hauptchromatogramms noch mit einem der Gipfel des Rechromatogramms eine Übereinstimmung. Ein nach der Methode des Hauptchromatogramms angefertigtes Vergleichselutiogramm mit ADP und käuflichem FAD der Firma Boehringer zeigte jedoch ebenfalls einen auf ADP folgenden Gipfel, der offenbar dem eingesetzten FAD bzw. dessen Spaltprodukt zuzurechnen ist.

Das Rechromatogramm R_6 der Fraktionen 188 - 215 des Hauptchromatogramms ist in Abbildung 13 wiedergegeben. Durch die Routinebestimmungen von Base, Ribose und Phosphat sowie durch die Papierchromatographie in den Systemen I, II und IV erwies sich der erste Gipfel eindeutig als UMP, die übrigen als UDP. Die Lage der Fraktionen 43 - 47 und 52 - 60 läßt veresterte Uridindiphosphate erwarten. Nach den Untersuchungen von R.B. Hurlbert und V.R. Potter (23) handelt es sich hier in einem Falle um Acetylglucosamin, im anderen um ein Gemisch aus Uridindiphosphatglucose und Uridindiphosphatgalaktose. Acetylglucosamin konnte mit der Methode von W.T.I. Morgan und L.A. Elson (39), Glucose mit dem Enzymtest der Firma Boehringer und Galaktose neben Glucose durch die Anthronmethode (30) nachgewiesen werden.

Alle vier Gipfel wurden ferner im System III chromatographiert (s. Abb. 14). UMP und UDP stimmen gut mit dem ersten und letzten peak von R_6 überein, die beiden mittleren Gipfel zeigen deutlich einen gegenüber UDP höheren R_F-Wert, der wohl auf die Veresterung zurückzuführen ist. Für diese beiden Stoffe waren uns Vergleichssubstanzen nicht zugängig. Wie man sieht, lassen sich UDPG und UDPGa in diesem System papierchromatographisch nicht voneinander trennen.

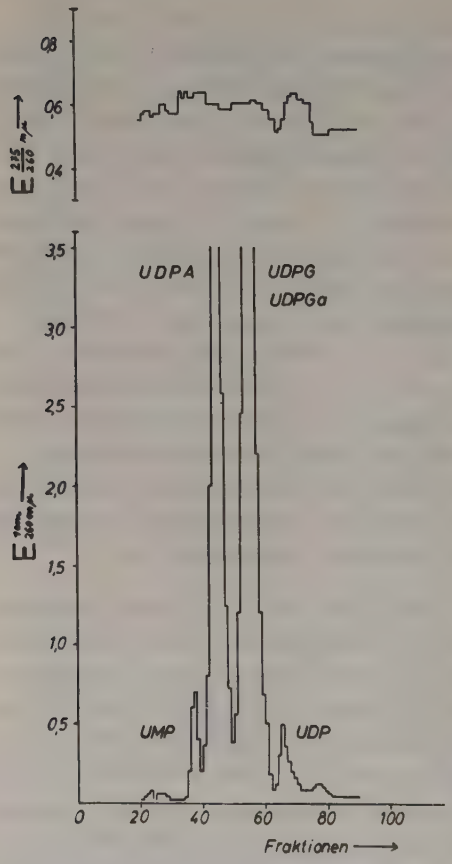


Abbildung 13: Rechromatogramm R_6 des Abschnitts VI des Hauptchromatogramms.
Säule: 27 x 0,8 cm
Mischflasche: 350 ml H_2O
Reservoir: 1n $HCOONH_4$

Abbildung 14: Photoprintkopie des in System III angefertigten Papierchromatogramms der isolierten Fraktionen von R_6 und der Vergleichssubstanzen

ander trennen. Nach vorsichtiger Hydrolyse wurden die Verbindungen der Fraktionen 43 - 47 und 52 - 60 in mit Wasser gesättigtem Phenol papierchromatographisch getrennt und mit Anilinphthalat besprüht. Acetylglucosamin und Glucose traten dabei stark, Galaktose nur unbefriedigend hervor.

Im nächsten Bild (Abb. 15) sind die Fraktionen 223 - 245 des Hauptchromatogramms rechromatographiert. Die im Rechromatogramm zwischen den Fraktionen 39 - 60 auftretenden Gipfel stammen noch aus den letzten Gefäßen des Abschnitts VI des Hauptchromatogramms und konnten als UMP, UDPG und UDP identifiziert werden. Der Nachweis von UDPGa in diesen Fraktionen ist uns nicht gelungen. Das Mol-Verhältnis Base:Ribose:Phosphat ergab für die

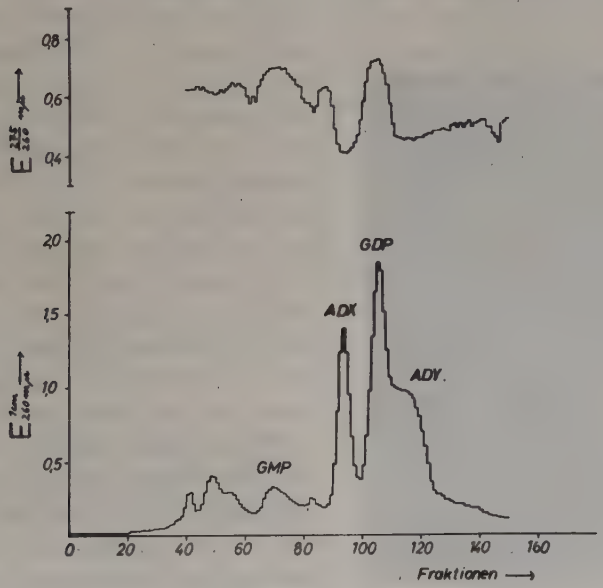


Abbildung 15: Rechromatogramm R_7 des Abschnitts VII des Hauptchromatogramms.

Säule: 26 x 0,8 cm
Mischflasche: 350 ml H_2O
Reservoir: 0 - 80 1n $HCOONH_4$
81 - Ende 2n $HCOONH_4$

Fraktionen 69 - 72 1:1:1 und für die Fraktionen 103 - 106 1:1:2. Der Quotient $\frac{E\ 275}{E\ 260}$ mμ ließ in beiden Fällen ein Guanosinderivat vermuten, was durch die spektralphotometrische und papierchromatographische Untersuchung gesichert werden konnte. Es muß sich also hier um GMP und GDP handeln, wobei das GMP als Zersetzungsprodukt des ursprünglich im Extrakt vorhandenen GDP aufzufassen ist.

In den Fraktionen 93 - 96 und 118 - 123 konnten wir durch eine Charakterisierung im UV-Licht Adeninderivate feststellen. Auch die durch Hydrolyse freigesetzte Base war in beiden Fällen in System IV papierchromatographisch mit Adenin identisch. Ein Vergleichselutiogramm, das wir durch Aufbringen von GDP und von mit Perchlorsäure behandeltem TPNH auf eine Dowex 1 Säule erhielten, ergab gleichfalls adeninhaltige peaks zwischen denen die Fraktionen des GDP lagen. Die Fraktionen 93 - 96 beinhalten offenbar ein Zersetzungsprodukt des ADPRP. Da wir neben wenig labilem Phosphat 2 Mol Gesamtphosphat pro Mol Base finden konnten, vermuten wir, daß es sich bei den mit ADX bezeichneten Fraktionen um ADP-2'-5' handelt. Eine endgültige Aussage darüber ist aber nur mit Hilfe spezifischer Nukleotidasen möglich. Auch das papierchromatographische Verhalten der mit ADX und ADY bezeichneten Substanzen in den Systemen I und II bekräftigt die Annahme, daß es sich bei den Fraktionen 112 - 123 um ADPRP und bei den Gefäßen 93 - 96 um ein Spaltprodukt desselben handelt. Der R_F-Wert der Fraktionen

Abbildung 16: Photoprintkopie des in System I angefertigten Papierchromatogramms der isolierten Fraktionen von R_7 und der Vergleichssubstanzen!

93 - 96 stimmt mit 5'-ADP nicht überein. Die Analyse ergab für die eigens in einer weiteren Säule gereinigten Fraktionen 118 - 123 ein Verhältnis Base:Ribose:Phosphat wie 1:1,8:2,7, wodurch die Anwesenheit von ADPRP gesichert erscheint.

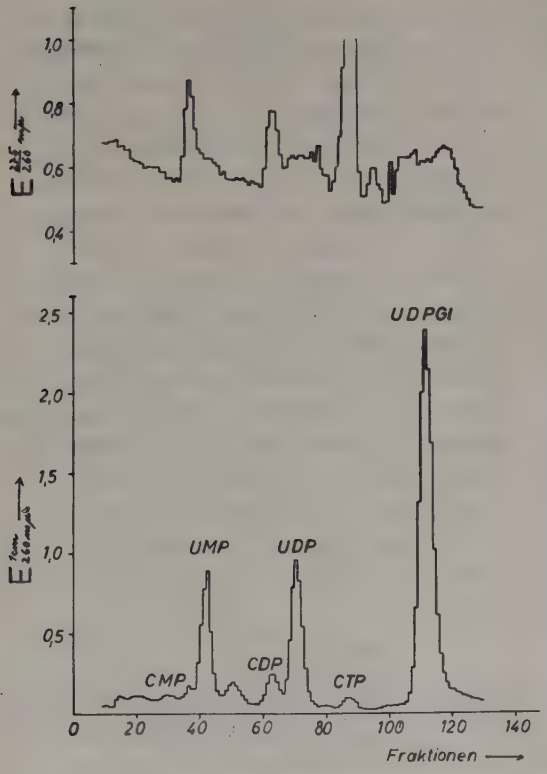


Abbildung 17: Rechromatogramm R_8 des Abschnitts VIII des Hauptchromatogramms.
Säule: 24,5 x 0,8 cm
Mischflasche: 350 ml H_2O
Reservoir: 0 - 80 1n $HCOONH_4$
81 - Ende 2n $HCOONH_4$

In der Abbildung 17 ist das Rechromatogramm der Fraktionen 252 - 269 des Hauptchromatogramms abgebildet. Die hohen Quotienten $\frac{E\ 275}{E\ 260}$ mμ lassen vermuten, daß es sich bei den Fraktionen 35 - 39, 62 - 65 und 85 - 91 um Cytosinderivate handelt. Aufgrund der Lage im Rechromatogramm und in Übereinstimmung mit anderen Autoren (24, 52) ist zwischen Gefäß 85 - 91 CTP zu erwarten, demzufolge sind dann die beiden anderen kleinen Gipfel als Zersetzungsprodukte zu deuten und zwar Fraktion 62 - 65 als CDP und Fraktion 35 - 39 als CMP. Eine Untersuchung mußte sich aus Substanzmangel auf die Basen dieser Stoffgruppe beschränken. Die gefundene Base war sowohl mit ihren UV-

Charakteristika als auch papierchromatographisch mit Cytosin identisch. Dagegen konnten aufgrund des Verhältnisses Base: Ribose:Phosphat und der spektralanalytischen Untersuchungen die Fraktionen 41 - 43 und 69 - 73 eindeutig als UMP und UDP gefunden werden. Dies beweist auch eine papierchromatographische Auftrennung in den Systemen I - IV. Der letzte Gipfel von R_8 erwies sich in Übereinstimmung mit R.B. Hurlbert und V.R. Potter (23) als UDPGl. Eine Analyse ergab das Mol-Verhältnis Base: Ribose:Phosphat wie 1:1,1:1,8. Glukuronsäure wurde mit der Methode von Z. Dische (17) nachgewiesen. Daß neben UDPGl auch UDP schon im Ausgangsextrakt vorliegt und kein Artefakt darstellt, konnten wir damit beweisen, daß wir die Fraktionen 262 - 265 des Hauptchromatogramms im System III vorsichtig papierchromatographisch trennten und UDP durch eine Vergleichssubstanz lokalisierten. Zu diesem Zwecke haben wir die betreffenden Fraktionen ohne vorherige Gefriertrocknung und nur im kalten Luftstrom eines Föhns auf Papier aufgetragen.

Abbildung 18: Photoprintkopie des in System III angefertigten Papierchromatogramms der isolierten Fraktionen von R_8 und der Vergleichssubstanzen.

In der Reihe der Rechromatogramme folgen jetzt die Fraktionen 270 - 291 des Hauptchromatogramms. R_9 ist gekennzeichnet durch die 3 Gipfel AMP, ADP und ATP, deren Bestimmung durch unsere Routineanalyse auf Art und Menge der Base und des Mol-Verhältnisses Ribose:Phosphat ohne Schwierigkeiten möglich ist. Das unterschiedliche papierchromatographische Verhalten dieser 3 Adenosinphosphate ist in Abbildung 20 wiedergegeben. Die letzten Fraktionen des im Hauptchromatogramm mit ATP bezeichneten Gipfels erscheinen aber durch eine weitere Verbindung verunreinigt, wie

sich aus dem Anstieg des Quotienten $\frac{E\ 275}{E\ 260}$ mμ im Hauptchromatogramm und im Rechromatogramm hinter dem ATP-Gipfel vermuten läßt. Die Fraktionen 94 - 100 des R_9 enthalten ein Uracilderivat und gehören noch zu Abschnitt VIII des Hauptchromatogramms. Ihre Anwesenheit ist auf eine ungenügende Abtrennung der Abschnitte VIII und IX zurückzuführen.

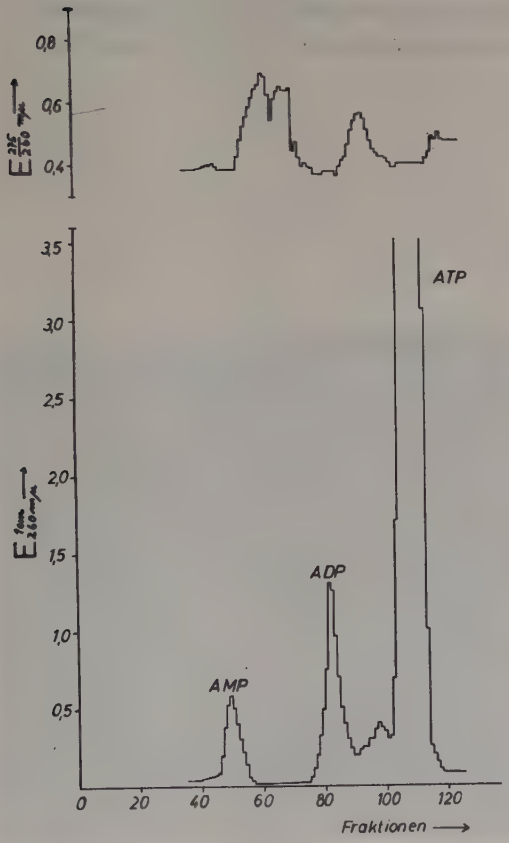


Abbildung 19: Rechromatogramm R_9 des Abschnitts IX des Hauptchromatogramms.
Säule: 25 x 0,8 cm
Mischflasche: 300 ml H_2O
Reservoir: 0 - 80 1n $HCOONH_4$
81 - Ende 2n $HCOONH_4$

Abbildung 20: Photoprintkopie des in System I angefertigten Papierchromatogramms der isolierten Fraktionen von R_9 und der Vergleichssubstanzen.

Als letztes Rechromatogramm (R_{10}) sollen die mit GTP, UTP und X bezeichneten Fraktionen 336 - 380 des Hauptchromatogramms gezeigt werden. Während im Abschnitt X papierchromatographisch nur GTP und UTP nachzuweisen ist, treten in R_{10} von beiden Verbindungen auch die Spaltprodukte auf. Dies ist auf den Lyophilisierungsprozeß und das anschließende umständliche Entfernen des in diesen Fraktionen vorhandenen Ammoniumformiats zurückzu-

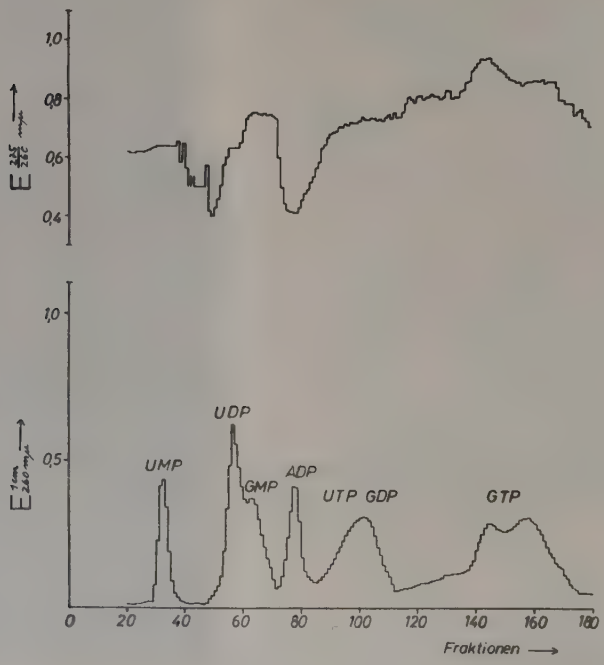


Abbildung 21: Rechromatogramm R_{10} des Abschnitts X des Hauptchromatogramms.

Säule:	26,5 x 0,8 cm
Mischflasche:	250 ml H_2O
Reservoir:	0 - 55 1n $HCOONH_4$
	56 - 100 2n $HCOONH_4$
	101 - Ende 2M $HCOONH_4$+0,75M HCOOH/l H_2O

führen. Die papierchromatographischen Untersuchungen in den Systemen I, II und IV ergaben für die Fraktionen 31 - 35 UMP und 55 - 59 UDP, ebenso für die Fraktionen 64 - 69 GMP und 90 - 108 eine Mischung aus GDP und UTP. Die spektralphotometrische Bestimmung des Basenanteils sowie das Mol-Verhältnis Base:Ribose: Phosphat bestätigte diese Befunde. In Tabelle 2 sind die Charakteristika beider Stoffe angegeben, nachdem sie papierchromatographisch getrennt wurden. Nur für die Fraktionen 140 - 155, in denen wir GTP vermuten, konnten wir keine befriedigenden UV-Charakteristika und Mol-Verhältnisse erzielen. Diese Fraktionen sind,wie Abbildung 22 zeigt, stark mit einem uns unbekannten Stoff verunreinigt. Die Fraktionen 76 - 80 identifizierten wir mittels Base-, Ribose- und Phosphatbestimmung sowie durch Papierchromatographie als ADP. Das Auftreten dieses Stoffes ist wohl auf das Vorhandensein eines sehr energiereichen Adenosinpyrophosphates im ursprünglichen Extrakt zurückzuführen, von dem wir nur das Zersetzungsprodukt ADP im Rechromatogramm wiedergefunden haben. Das Vorkommen einer derartigen Verbindung, vielleicht Adenosintetraphosphat, in einem Ionenaustauscherchromatogramm ist bisher noch nicht bekannt. Die

Abbildung 22: Photoprintkopie des in System I angefertigten Papierchromatogramms der isolierten Fraktionen von R_{10} und der Vergleichssubstanzen.

letzten Fraktionen eines aufgetrennten Leberextraktes werden in der Literatur allgemein als GTP und UTP bezeichnet, obwohl die Form des Verlaufes der Extinktionskurve des Hauptchromatogramms mindestens einen weiteren Stoff erwarten läßt. Die Sicherung dieser Vermutung muß aber weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Als Bezugssystem für quantitative Angaben über den Gehalt einzelner Verbindungen im sauren Gewebsextrakt verwenden wir ihren prozentualen Anteil an der Gesamtextinktion des Nukleotidextraktes. Das Feuchtgewicht eines Organs erscheint uns als Bezugssystem für quantitative Aussagen nur bedingt geeignet. Im Falle einer vergleichenden Untersuchung bei verschiedenen Funktionszuständen des gleichen Organs, wie das in der vorliegenden Arbeit geschehen soll, ist das Feuchtgewicht als Ausgangswert nicht brauchbar. Bei der Leberregeneration tritt ein starkes Ödem auf, d.h. eine Vermehrung des Wassergehaltes. In der toxisch geschädigten Leber findet sich immer eine auch morphologisch nachweisbare Vermehrung der Lipoide. Eine aufschlußreichere Angabe hinsichtlich des Gehaltes einzelner Nukleotide liefert daher ihr Verhältnis zum Gesamtgehalt an Nukleotiden. Selbstverständlich läßt eine derartige quantitative Auswertung keine Rückschlüsse auf den tatsächlichen Gehalt der isolierten Nukleotide im Ausgangsmaterial zu, da ja die Extinktion bei 260 mμ dieser Stoffe als Folge ihrer verschiedenen Basen sehr unterschiedlich ist. Vielmehr ermöglicht eine derartige Berechnung Aussagen über die relativen Quantitätsunterschiede der Nukleotide in verschiedenen Funktionszuständen des gleichen Organs.

Die Gesamtextinktion errechneten wir aus der Summe der Extinktionen der Fraktionen des Hauptchromatogramms unter Berücksichtigung ihrer Volumina und der Eigenextinktion des Elutionsmittels. Im Durchschnitt liegt die Gesamtextinktion aller Fraktionen etwa 25% unter der Extinktion des auf die Säule aufgebrachten Extraktes, die Extinktion des vor Beginn der Elution abfließenden Waschwassers schon abgerechnet. Diese Differenz ist aus den Spalten 2 und 3 der Tabelle 3 zu ersehen. Eine Ursache dafür kann

sein, daß einerseits Stoffe in den sauren Extrakt gelangen, die erst nach Fraktion 500 oder mit stärkeren Elutionsmitteln wieder von der Säule gewaschen würden und daß andererseits die nicht polare Haftfestigkeit der Nukleotide zu einem Teil irreversibel ist.

In Tabelle 3 sind die Prozentanteile der Abschnitte I - X des Hauptchromatogramms an der Gesamtextinktion in den Versuchen A - E wiedergegeben. Ein Vergleich der untereinander stehenden Werte zeigt für die verschiedenen Abschnitte teilweise recht erhebliche Abweichungen vom Mittelwert. Der Grund hierfür wird erst nach Aufschlüsselung jedes Abschnitts in deren Komponenten ersichtlich, wie dies in Tabelle 4 geschieht *).

Entsprechend den Rechromatogrammen umfaßt Abschnitt I die Stoffe DPN, AMP, CMP und Harnsäure. Der mit Nummer 1 bezeichnete Gipfel wird quantitativ nicht ausgewertet.

Abschnitt II besteht aus einem qualitativ und quantitativ nicht erfaßten Stoff und AMP, das noch aus den Fraktionen des ersten Abschnitts stammt und daher diesem zugerechnet wird.

Abschnitt III setzt sich zusammen aus TPN und GMP, Abschnitt IV aus UMP, IMP, ADPR und dem in unsere quantitativen Bestimmungen nicht einbezogenen CDP.

---

*) In Tabelle 4 und allen weiteren Konzentrationszusammenstellungen bedeuten

$\bar{x}$ = arithmetischer Mittelwert

s = Standardabweichung, die sich nach der Formel berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{(x_1-\bar{x})^2+(x_2-\bar{x})^2+(x_n-\bar{x})^2}{n-1}}$$

$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$ = Variationskoeffizient

Tabelle 3

Normale Rattenleber: Prozentanteil der Abschnitte des Hauptchromatogramms an $\sum E_{260\,m\mu}$ aller Fraktionen

Versuch	$E_{260\,m\mu}$		Abschnitte des Hauptchromatogramms									
	des Extraktes	aller Fraktionen	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
A		3468.7	31.30	1.52	5.90	7.95	22.87	9.40	4.35	2.96	11.21	2.48
B	4820.9	3724.4	28.19	1.13	4.28	5.70	23.32	8.83	4.45	3.29	17.56	3.21
C	6417.4	3905.5	20.17	1.02	3.53	4.78	25.25	8.85	5.99	3.03	22.68	4.54
D	4481.0	3990.8	25.25	1.04	4.17	5.87	25.91	10.57	4.97	3.69	14.77	3.61
E	4460.0	3626.9	20.51	1.04	4.07	5.29	25.05	7.64	4.75	6.45	21.46	3.69
Mittelwert	5044.8	3743.3	25.10	1.15	4.39	5.91	24.47	9.05	4.90	3.88	17.53	3.50

Tabelle 4

Normale Rattenleber: Prozentanteil der isolierten Nukleotide an $\Sigma E_{260\,m\mu}$ aller Fraktionen des Hauptchromatogramms

ersuch	Isolierte Nukleotide																
	DPN	CMP	AMP	HS	TPN	GMP	UMP	IMP	ADPR	ADP	UDPA	UDPGa UDPG	ADPRP	GDP	UDP	UDPGl	ATP	GTP UTP X
A	4.04	0.65	21.25	0.55	2.24	2.87				19.53	3.51	5.09	1.88	2.25	0.64	2.01	11.21	2.48
B	3.75	0.72	19.90	0.43	1.07	2.74	3.52	0.52	1.12	18.27	2.95	5.71	2.01	2.02	0.65	2.30	17.56	3.21
C	3.43	0.53	14.25	0.13	0.81	2.37	2.55	0.71	1.03	20.12	3.15	5.54	2.68	2.87	0.81	1.94	22.68	4.54
D	4.04	0.64	19.00	0.48	1.32	2.72	2.82			20.59	3.74	6.12					14.77	3.61
E	3.64	0.59	14.50	0.07	1.04	2.61	3.13	0.53	1.11	19.14	3.19	4.28	2.17	2.32	0.98	2.93	21.46	3.69
$\bar{x}$	3.78	0.62	17.78	0.33	1.29	2.66	3.00	0.58	1.08	19.53	3.30	5.34	2.18	2.36	0.77	2.29	17.53	3.50
s	0.26	0.07	3.21	0.22	0.56	0.19	0.42	0.11	0.05	0.90	0.31	0.70	0.35	0.36	0.16	0.45	4.72	0.75
$\frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$	6.98	11.29	18.05	65.75	43.17	7.03	13.86	18.44	4.62	4.58	9.51	13.14	16.05	15.25	20.77	19.65	26.92	21.45

Gemäß Rechromatogramm R_5 gehören ADP und die als 3, 4 und 5 bezeichneten Gipfel zum Abschnitt V. Der prozentuale Anteil von ADP an der Gesamtextinktion ergibt sich aus der Summe der Extinktionen von ADP und des durch Spaltung aus diesem entstandenen AMP, da ja beide Verbindungen die gleichen UV-Charakteristika besitzen. Die nach H. Schmitz (52) zur FAD-Gruppe gehörenden Fraktionen werden in die quantitativen Betrachtungen nicht mit einbezogen, da ihre Identität nicht völlig geklärt ist.

UDPA und UDPG + UDPGa gehören zum Abschnitt VI. Die Extinktionswerte der im Rechromatogramm daneben auftretenden Spaltprodukte UMP und UDP werden addiert und ein Drittel dem Gipfel UDPA und zwei Drittel den Fraktionen UDPG + UDPGa zugerechnet. Die dabei errechneten Werte stimmen annähernd mit den im Hauptchromatogramm ermittelten Extinktionssummen für UDPA und UDPG + UDPGa überein. Eine Berechnung dieser beiden Komponenten ist wegen ihrer weitgehenden Trennung schon im Hauptchromatogramm möglich, wenn man am Minimum der beiden sich überlappenden Kurventeile ein Lot auf die Abszisse fällt.

Wie Abbildung 15 auf Seite 29 zeigt, ist bei der Rechromatographie eine Aufspaltung der beiden ursprünglichen Komponenten erfolgt. Wegen der weitgehenden Überlappung von GDP und ADPRP in R_7 bei der Elution mit dem hier verwendeten Ammoniumformiat kann das Rechromatogramm zur Berechnung nur überschlagsweise dienen. Wir betrachten daher das Kurvenminimum von Abschnitt VII des Hauptchromatogramms als Trennlinie von ADPRP und GDP und addieren die Extinktion der Fraktionen des Hauptchromatogramms dieser beiden Stoffe. Von dem so erhaltenen Wert rechnen wir noch 10% ab, da auch bei der Rechromatographie der anderen Abschnitte etwa 10% Substanz verloren gehen.

Der Abschnitt VIII umfaßt die Stoffe UDP und UDPGl. Das daneben im Rechromatogramm R_8 auftretende UMP ist als Spaltprodukt des UDP aufzufassen. Es ist anzunehmen, daß in gleichem Maße wie sich UDP zu UMP zersetzt, auch UDPGl zu UDP abgebaut

wird. Aus diesem Grunde wird der Extinktionswert von UMP im selben Verhältnis den Verbindungen UDP und UDPGl zugeordnet. CTP, das gleichfalls in R_8 auftritt, wird nicht berechnet.

Die Berechnung von ATP im Rechromatogramm R_9 erfolgt durch Summierung der Extinktionswerte von AMP, ADP und ATP. Der auf diese Weise erhaltene Wert stimmt mit der Gesamtextinktion des Abschnitts IX überein.

Da uns eine Trennung der in Abschnitt X enthaltenen Verbindungen GTP, UTP und weiterer noch unbekannter Stoffe nicht in ausreichendem Maße gelang, können quantitative Aussagen über GTP und UTP nur überschlagsweise gemacht werden.

Die in Tabelle 4 aufgeführten Mittelwerte der isolierten Nukleotide charakterisieren den Durchschnittswert von 40 Ratten, da ja für jeden der 5 Versuche 8 Tiere eingesetzt wurden.

Der Vergleich der Versuchsreihen untereinander zeigt im Bereich der Adenosinphosphate Variationskoeffizienten, die für AMP 18,1% und ADP 4,6% betragen. Bei ATP erfahren sie mit 26,9% ihre stärkste Schwankungsbreite. Betrachtet man anstelle der Einzelstoffe die Summe der prozentualen Anteile von AMP + ADP + ATP am Gesamtnukleotidgehalt, so ergibt sich, wie Tabelle 5 zeigt, eine weitgehende Übereinstimmung.

Die unterschiedlichen Werte der Adenosinphosphate liegen vor allem in einer Verschiebung des Verhältnisses Mono- zu Triphosphat begründet und nicht in einer Veränderung des Gesamtgehaltes an Adenosinphosphaten. Ob diese Verschiebung auf eine Aufspaltung des energiereichen ATP während der Aufarbeitung oder auf Unterschiede im biologischen Ausgangsmaterial zurückzuführen ist, möge dahingestellt bleiben.

Im Gegensatz dazu zeigen die für GMP und GDP berechneten prozentualen Anteile eine befriedigende Übereinstimmung.

Bei den Uridinphosphaten UMP, UDP, UDPA, UDPG + UDPGa und UDPGl ist ein etwas größerer Variationskoeffizient der Einzelkomponenten zu beobachten (s. Tab. 4). Dieser hat bei UDP mit 20,8%

Tabelle 5

Prozentualer Anteil der Summe der Adenosinphosphate AMP + ADP + ATP an der Gesamtextinktion aller Fraktionen in den Versuchen mit normaler Rattenleber

Normale Rattenleber	%-Summe AMP+ADP+ATP
Versuch A	52,0
B	55,7
C	57,1
D	54,4
E	55,1
$\bar{x}$	54,8
s	1,9
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	3,4%

Tabelle 6

Prozentualer Anteil der Summe der Uracilnukleotide an der Gesamtextinktion aller Fraktionen in den Versuchen mit normaler Rattenleber.

Normale Rattenleber	%-Summe Uracilnukleotide
Versuch B	15,1
C	14,0
E	14,5
$\bar{x}$	14,5
s	0,6
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	3,9%

seinen Höchstwert. Dagegen beträgt er bei der Summe der Uracilverbindungen der Versuchsreihen nur 3,9% (s.Tab. 6).

Eine vergleichende Betrachtung von DPN, TPN, ADPR und ADPRP - die beiden letztgenannten sind Zersetzungsprodukte des DPNH und TPNH - ergibt mit Ausnahme von TPN eine befriedigende Übereinstimmung der Einzelwerte. Die große Mittelwertabweichung für die TPN-Werte beruht offenbar auf dem extrem hohen Wert des Versuches A (s. Tab. 4).

Die Summe dieser Stoffe der Versuche B, C und E ergibt dagegen eine völlige Gleichheit.

Tabelle 7

Prozentualer Anteil der Summe von DPN, TPN, ADPR und ADPRP an der Gesamtextinktion aller Fraktionen in den Versuchen mit normaler Rattenleber.

Normale Rattenleber	%-Summe DPN+TPN+ADPR+ADPRP
Versuch B	8,0
C	8,0
E	8,0
$\bar{x}$	8,0
s	0,0
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	0,0%

Für die übrigen in Tabelle 4 aufgeführten Verbindungen CMP, HS und IMP fällt nur der überaus große Fehler im Falle der Harnsäure auf.

II) Der Nukleotidgehalt im regenerierenden Leberparenchym der Ratte

Über den Nukleotidgehalt der regenerierenden Leber liegen bisher keine Untersuchungen an Ionenaustauschern vor. Nur von H. Schmitz (54) wird ein der normalen Leber "ähnliches" Chromatogramm beschrieben. Vergleichende Studien an normalen und regenerierenden Lebern, also an Geweben verschiedener Funktionszustände, sind aber deswegen von großem Interesse, weil mit dem stark gesteigerten Ersatzwachstum auch eine Änderung im Stoffwechsel und damit im Nukleotidgehalt zu erwarten ist.

Durch die quantitative Aufschlüsselung von 4 gleichartigen Versuchen ermittelten wir den Gehalt an freien Nukleotiden in der regenerierenden Rattenleber. Zur Gewinnung von 48 g regenerierenden Leberparenchyms waren 16 Tiere erforderlich, denen 43 - 46 Stunden vor ihrer Aufarbeitung ca. 60% des Organs entnommen wurden. Die Herstellung des sauren Extraktes der regenerierenden Leber erfolgte, wie im Falle der normalen Leber, mit der in Abschnitt 2, Seite 76 beschriebenen Methode. Bei der regenerierenden Rattenleber erhielten wir die gleiche qualitative Nukleotidzusammensetzung wie beim normalen Organ (s. Abb. 23). Auch hier wurde in gleicher Weise eine Aufteilung des Hauptchromatogramms in 10 Unterabschnitte vorgenommen. Die Identifizierung der Gipfel in den Rechromatogrammen erfolgte wie bei der normalen Leber beschrieben. Auf eine Wiedergabe der Rechromatogramme, die qualitativ mit denen des vorherigen Abschnittes übereinstimmen und sich nur durch die Größe der Gipfel unterscheiden, sowie der Papierchromatogramme wird verzichtet.

Bereits ein Vergleich der prozentualen Anteile der Abschnitte I - X des Hauptchromatogramms an der Gesamtextinktion der regenerierenden Rattenleber zeigt wesentliche Unterschiede gegenüber denen des normalen Gewebes (s. Tab. 8). So fällt vor allem die 26,5%ige Erhöhung des prozentualen Anteils des Abschnittes IV der regenerierenden Leber auf. Desgleichen sind die Abschnitte VI um 22,8% und VIII um 34,5% erhöht, während in Abschnitt IX und X bei der regenerierenden Leber eine Erniedrigung um 27,9%

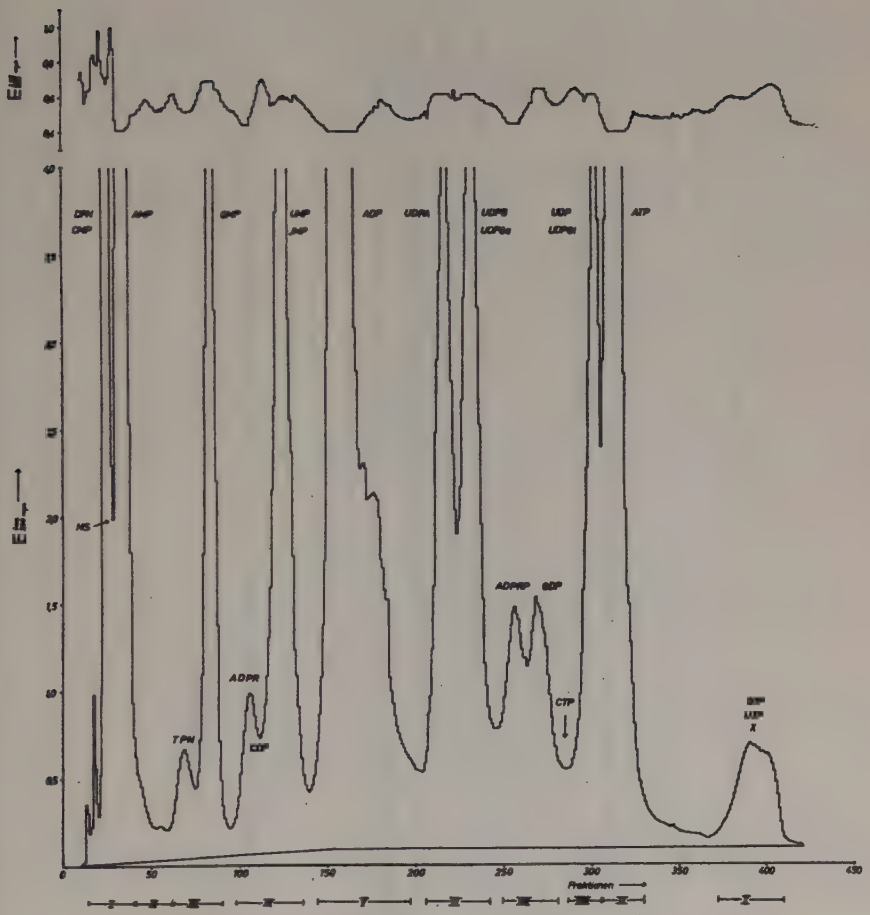


Abbildung 23 : Regenerierende Rattenleber. Hauptchromatogramm des Versuchs G.

Säule : 31 x 1cm
Mischflasche : 500 ml H_2O
Reservoir : 0 -125 4 n HCOOH
126-205 4 M HCOOH + 0,2 M $HCOONH_4$ / 1 H_2O
206-285 4 M HCOOH + 0,4 M $HCOONH_4$ / 1 H_2O
286-Ende 4 M HCOOH + 0,8 M $HCOONH_4$ / 1 H_2O

Tabelle 8

Regenerierende Rattenleber:

Prozentanteil der Abschnitte des Hauptchromatogramms an $\Sigma E_{260\,m\mu}$ aller Fraktionen

Versuch	$\Sigma E_{260\,m\mu}$		Abschnitte des Hauptchromatogramms									
	des Extraktes	aller Fraktionen	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
F		2803.5	30.21	1.20	4.74	8.01	23.57	11.69	4.43	4.86	8.82	2.42
G	7015.4	3576.0	32.33	1.05	4.71	7.95	22.53	10.30	4.23	4.24	10.19	2.43
H	4595.9	3325.8	21.83	1.01	3.92	7.77	23.24	11.56	4.16	6.40	16.58	3.47
J	5506.0	3795.0	24.45	1.18	4.65	6.21	21.56	10.96	7.34	5.38	14.93	3.29
Mittelwert	5705.8	3375.0	27.20	1.11	4.50	7.48	22.72	11.12	5.04	5.22	12.63	2.90

Tabelle 9

Regenerierende Rattenleber: Prozentanteil der isolierten Nukleotide an $\sum E_{260\,m\mu}$ aller Fraktionen des Hauptchromatogramms

Versuch	Isolierte Nukleotide																
	DPN	CMP	AMP	HS	TPN	GMP	UMP	IMP	ADPR	ADP	UDPA	UDPGa UDPG	ADPRP	GDP	UDP	UDPGl	ATP	GTP UTP X
F	3.23	0.80	23.20	0.27	1.10	3.06	5.90	0.40	0.97	21.30	5.33	5.84	1.75	2.44	1.23	3.15	8.82	2.42
G	3.05	1.13	25.31	0.25	0.86	3.37	5.57	0.37	1.17	17.77	4.69	5.41	1.83	2.05	0.89	2.88	10.19	2.43
H	3.85	1.19	13.80	0.08	0.70	2.81	5.45	0.30	1.23	18.35	5.17	6.38	1.65	2.29	0.81	4.73	16.58	3.47
I		0.74	15.18	0.10		2.69		0.41	1.23	17.54	4.28	6.51		2.16			14.93	3.29
$\bar{x}$	3.37	0.96	19.37	0.17	0.88	2.98	5.64	0.37	1.15	18.74	4.86	6.03	1.74	2.23	0.97	3.58	12.63	2.90
s	0.42	0.23	5.73	0.10	0.20	0.30	0.23	0.05	0.12	1.74	0.48	0.51	0.09	0.17	0.22	1.00	3.71	0.56
$\frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$	12.46	23.75	29.58	58.23	22.95	10.10	4.13	13.24	10.69	9.28	9.81	8.40	5.17	7.53	22.98	27.90	29.37	19.17

und 17,1% festzustellen ist. Worauf dies zurückzuführen ist, zeigt eine Aufgliederung der Abschnitte des Hauptchromatogramms in deren Komponenten (s. Tab. 9).

Die Summe der Adenosinphosphate AMP + ADP + ATP stimmt in allen Versuchen mit regenerierender Rattenleber weitgehend überein. Der Variationskoeffizient beträgt nur 5,9%.

Tabelle 10

Prozentualer Anteil der Summe der Adenosinphosphate AMP + ADP + ATP an der Gesamtextinktion aller Fraktionen in den Versuchen mit regenerierender Rattenleber.

Regenerierende Rattenleber	%-Summe AMP+ADP+ATP
Versuch F	53,3
G	53,3
H	48,7
I	47,7
$\bar{x}$	50,7
s	3,0
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	5,9%

Dagegen sind die Veränderungen der Einzelkomponenten AMP, ADP und ATP im Lebergewebe dieser beiden Funktionszustände wegen der beträchtlichen Variationskoeffizienten nicht signifikant.

Nachfolgende Abbildung veranschaulicht die Konzentrationsänderungen an AMP, ADP und ATP. So nimmt AMP um 8,9% in der regenerierenden Leber zu, während ADP um 4,1% und ATP um 28,0% abnehmen.

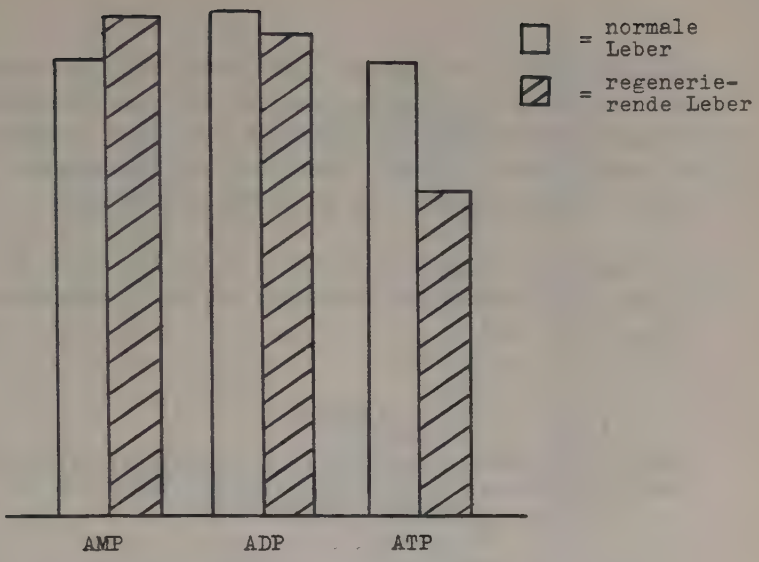


Abbildung 24: Vergleich der prozentualen Anteile des AMP, ADP und ATP an der Gesamtextinktion aller Fraktionen bei der normalen und regenerierenden Rattenleber.

Der Gehalt aller Adenosinphosphate ist in der regenerierenden Leber um 7,5% geringer als im normalen Gewebe. Diese Erniedrigung ist signifikant ($p < 0{,}05$) *).

---

*) Wir unterstellen, daß die errechneten Gehaltsangaben Varianzhomogenität aufweisen und normal verteilt sind. Die Signifikanz berechnen wir daher nach dem t-Test.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sigma_{Diff.}} \qquad \sigma_{Diff.} = \sqrt{\frac{n_1 \cdot s_1^2 + n_2 \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}$$

Freiheitsgrad $\nu = n_1 + n_2 - 2$

p errechnet sich aus dem Testquotient t unter Berücksichtigung des Freiheitsgrades ν und gibt an, unter wieviel von 100 Fällen Irrtumswahrscheinlichkeit besteht. Als Signifikanzschranke soll gelten $p < 0{,}05$, d.i. 5%.

Die Einzelwerte für GMP und GDP stimmen bei den Versuchen F, G, H und I gut überein (s. Tab. 9). Der durchschnittliche Prozentgehalt an GMP ist - wie aus Abbildung 25 ersichtlich - im regenerierenden Organ verglichen mit dem normalen nur schwach erhöht und bei GDP geringfügig erniedrigt.

Die Summen der Uracilnukleotide aus den Versuchen F, G und H zeigen eine gute Übereinstimmung. Der Variationskoeffizient beträgt nur 7,4%.

Tabelle 11

Prozentualer Anteil der Summe der Uracilnukleotide an der Gesamtextinktion aller Fraktionen in den Versuchen mit regenerierender Rattenleber.

Regenerierende Rattenleber	%-Summe Uracilnukleotide
Versuch F	21,5
G	19,4
H	22,5
$\bar{x}$	21,1
s	1,6
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	7,4%

Eine Gegenüberstellung des prozentualen Anteils der Summe aller isolierten Uracilnukleotide von normaler und regenerierender Leber zeigt bei dieser einen gewaltigen Anstieg um 45,4%. Diese Vermehrung ist hochsignifikant ($p < 0,005$).

Ähnlich wie im Falle der Adenosinphosphate ist auch bei den Uridinphosphaten vom Mittelwert eines Nukleotides eine stärkere Abweichung zu verzeichnen als vom Mittelwert ihrer Summen. Bemerkenswert ist, daß jedes der Uridinphosphate in der regene-

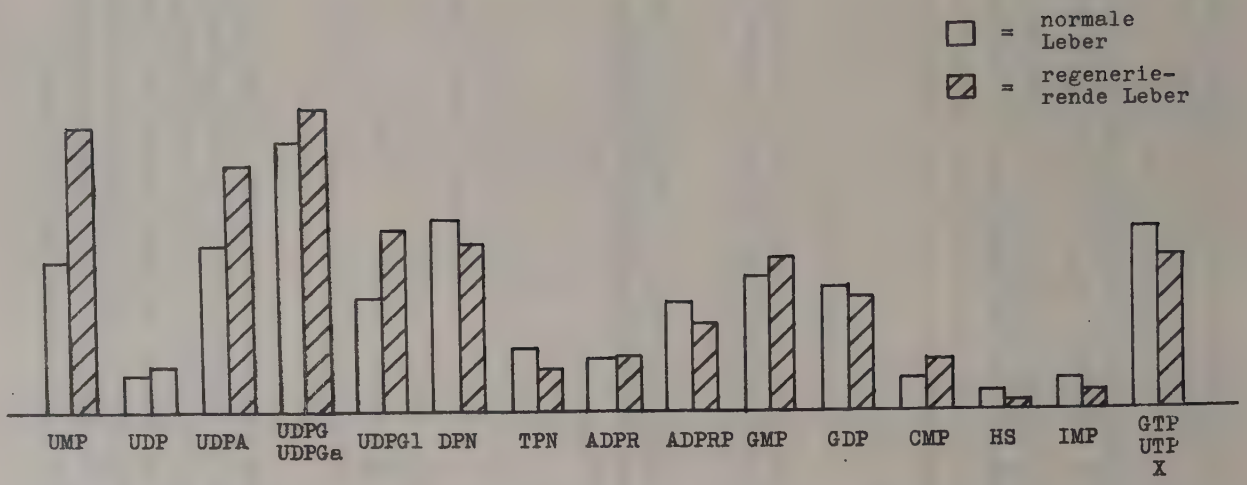


Abbildung 25: Vergleich der prozentualen Anteile der isolierten Nukleotide an der Gesamtextinktion aller Fraktionen der normalen Rattenleber und dem regenerierenden Lebergewebe.

rierenden Rattenleber stark zunimmt. Am augenfälligsten ist dies bei UMP mit 88,0%, UDPGl mit 56,3% und UDPA mit 47,3%. Die Zunahme an UDPGl ist signifikant ($p \approx 0{,}05$), bei UMP und UDPA sogar sehr signifikant ($p < 0{,}0005$ und $p < 0{,}0025$). Daneben sind auch UDP um 26,0% und UDPG + UDPGa um 12,9% erhöht.

Für die Summe des Prozentgehaltes von DPN, TPN und der verwandten Verbindungen ADPR und ADPRP wird für die Versuche F, G und H der Mittelwert 7,1 gefunden. Dieser um 10,3% niedrigere Gehalt der regenerierenden Leber ist sehr signifikant ($p < 0{,}01$).

Tabelle 12

Prozentualer Anteil der Summe DPN + TPN + ADPR + ADPRP an der Gesamtextinktion aller Fraktionen in den Versuchen mit regenerierender Rattenleber.

Regenerierende Rattenleber	%-Summe DPN+TPN+ADPR+ADPRP
Versuch F	7,1
G	6,9
H	7,4
$\bar{x}$	7,1
s	0,3
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	3,8%

Die Standardabweichung der Einzelstoffe in den Versuchen mit regenerierendem Lebergewebe beträgt - wie aus Tabelle 9 zu ersehen ist - für DPN 12,5%; TPN 23,0%; ADPR 10,7% und ADPRP 5,2%. Eine augenfällige Erniedrigung des Gehaltes an diesen Verbindungen gegenüber der des normalen Parenchyms erfahren das TPN mit 31,8% und das ADPRP mit 20,2%. Darüber hinaus sind DPN um 10,9% erniedrigt, ADPR hingegen um 6,5% erhöht.

Signifikant erscheint uns auch die Vermehrung von CMP um 54,8% ($p < 0,025$) bei regenerierender Leber, sowie die Verringerung an IMP um 36,2% ($p < 0,025$).

Auch die Verbindungen des Abschnitts X des Hauptchromatogramms der regenerierenden Rattenleber, die neben den nicht identifizierten Anteilen vor allem GTP und UTP enthalten, erfahren eine Erniedrigung um 17,2% gegenüber ihrem Gehalt im normalen Organ.

III) Die Konzentration der Nukleotide in der Rattenleber im Verlaufe der Buttergelb-Fütterung

Neben dem Vergleich der Nukleotidzusammensetzung bei normaler und regenerierender Rattenleber interessiert als dritter Funktionszustand dieses Organs das durch Buttergelb-Fütterung hervorgebrachte Hepatom. Die Gegenüberstellung dieser drei Versuchsreihen ermöglicht Aussagen darüber, ob Unterschiede im Funktionszustand der Leber ihren Ausdruck in der Nukleotidzusammensetzung finden. Tatsächlich konnten wir solche Verschiedenheiten auch nachweisen und zwar schon 30 Tage nach Beginn der Fütterung von Buttergelb, also bereits vor dem Auftreten eines histologisch nachweisbaren Lebertumors.

Um die Entwicklung des Buttergelb-Krebses in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer des Cancerogens zu studieren, wurden in je 3 parallelen Versuchen 4 Gruppen von Ratten über 30, 60, 100 und 150 Tage mit p-dimethylaminoazobenzol-haltigem Gebäck gefüttert. Dazu verabfolgten wir den Tieren, Sprague-Dawley-Ratten von 200 g Körpergewicht, eine vitaminreiche Standardkost, die 0,05% 4-Dimethylaminoazobenzol enthält. Dieses Futter setzt sich wie folgt zusammen:

Weizenmehl	2800 g
Zucker	600 g
Lebertran	150 g
Speiseöl	150 g
Malzextrakt	300 g
Bäckerhefe	120 g
Wasser	1000 g
Kochsalz	105 g
Magermilch	150 g
Nährhefe	150 g
4-Dimethylaminoazobenzol	2,763 g.

Nach Ablauf der Einwirkungsdauer des Cancerogens werden 8 Tiere einer Gruppe dekapitiert und deren Organe gemeinsam nach der auf Seite 76 beschriebenen Methode aufgearbeitet.

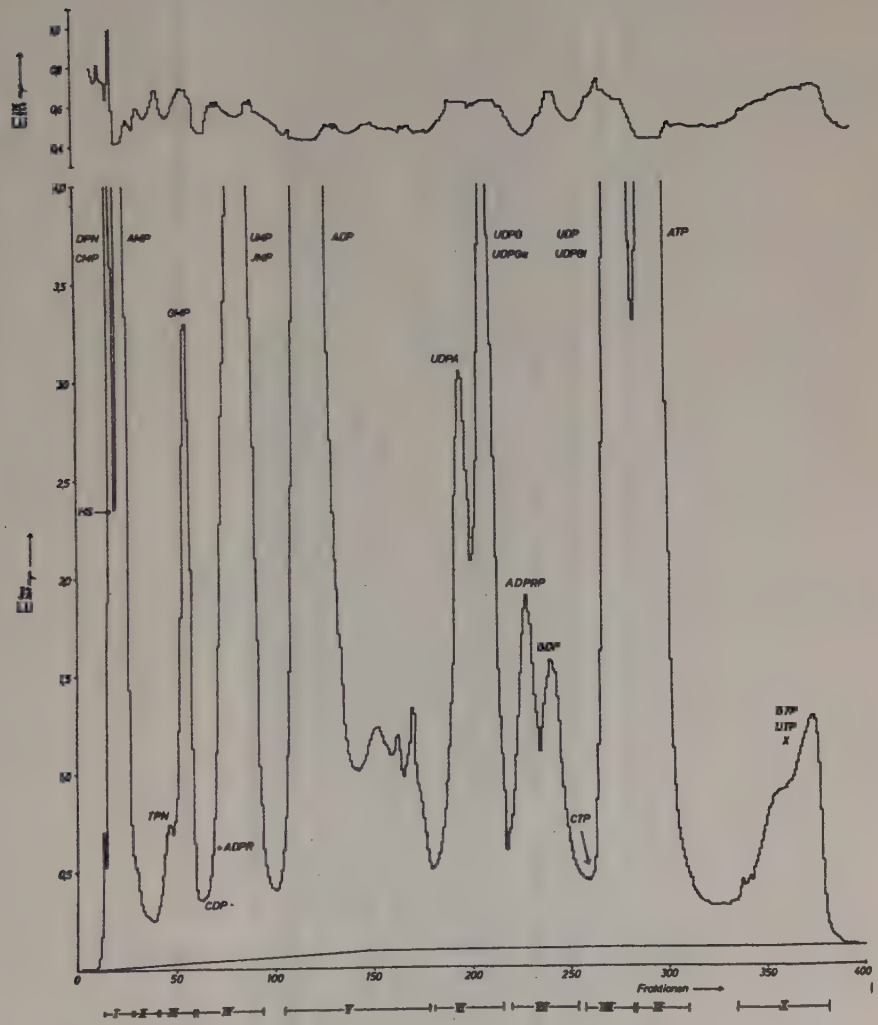


Abbildung 26 : Rattenleber nach 60 tägiger Schädigung durch Buttergelb. Hauptchromatogramm des Versuchs P.

Säule : 30 x 1 cm
Mischflasche : 500 ml H_2O
Reservoir : 0 -125 4 n HCOOH
126-205 4 M HCOOH + 0,2 M $HCOONH_4$ / 1 H_2O
206-285 4 M HCOOH + 0,4 M $HCOONH_4$ / 1 H_2O
286-Ende 4 M HCOOH + 0,8 M $HCOONH_4$ / 1 H_2O

Tabelle 13

Rattenleber nach 30 Tagen Buttergelb-Fütterung:
Prozentanteil der Abschnitte des Hauptchromatogramms an $\Sigma E_{260\,m\mu}$ aller Fraktionen

Versuch	$E_{260\,m\mu}$		Abschnitte des Hauptchromatogramms									
	des Extraktes	aller Fraktionen	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
K	5855.0	4011.8	19.81	0.97	3.33	8.69	26.51	10.35	4.30	5.32	16.94	3.72
L	5635.5	4229.4	21.31	1.02	4.44	4.86	25.01	8.21	4.79	6.08	20.54	3.70
M	7210.8	3977.9	20.43	0.96	4.34	6.70	24.31	7.44	5.45	4.35	22.16	3.82
Mittelwert	6233.8	4073.0	20.51	0.98	4.03	6.75	25.27	8.66	4.84	5.25	19.88	3.74

Tabelle 14

Rattenleber nach 30 Tagen Buttergelb-Fütterung: Prozentanteil der isolierten Nukleotide an $\Sigma E_{260\,m\mu}$ aller Fraktionen des Hauptchromatogramms

Versuch	Isolierte Nukleotide																
	DPN	CMP	AMP	HS	TPN	GMP	UMP	IMP	ADPR	ADP	UDPA	UDPGa UDPG	ADPRP	GDP	UDP	UDPGl	ATP	GTP UTP X
K	2.93	1.11	12.75	0.37	0.59	2.42	3.23		0.72	20.80	3.65	6.49	2.10	1.80	0.94	3.88	16.94	3.72
L	4.31	0.83	13.70	0.09	1.23	2.75	2.65	0.80	0.90	21.07	3.86	4.15	2.65	1.73	1.06	4.41	20.54	3.70
M	4.35	0.55	13.01	0.03	0.96	2.85	4.20	0.70	1.08	20.31	3.13	4.30	2.37	2.78	0.74	3.16	22.16	3.82
$\bar{x}$	3.86	0.83	13.15	0.16	0.92	2.67	3.36	0.75	0.90	20.72	3.54	4.98	2.37	2.10	0.91	3.81	19.88	3.74
s	0.81	0.28	0.49	0.18	0.32	0.23	0.78	0.07	0.18	0.39	0.38	1.31	0.28	0.59	0.16	0.63	2.67	0.07
$\frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$	20.93	33.70	3.73	113.12	34.89	8.42	23.30	9.33	20.00	1.85	10.62	26.30	11.60	27.95	17.80	16.45	13.43	1.73

Tabelle 15

Rattenleber nach 60 Tagen Buttergelb-Fütterung:

Prozentanteil der Abschnitte des Hauptchromatogramms an $\Sigma E_{260\,m\mu}$ aller Fraktionen

Versuch	$E_{260\,m\mu}$		Abschnitte des Hauptchromatogramms									
	des Extraktes	aller Fraktionen	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
N		3970.3	18.52	0.68	3.75	7.16	25.43	11.16	3.49	7.91	19.58	
O		3766.4	16.78	0.90	3.19	6.23	23.48	9.96	3.94	8.86	21.87	4.75
P	5598.5	4016.7	20.69	0.89	3.72	7.49	24.23	9.85	4.00	7.79	17.40	3.90
Mittelwert		3917.8	18.66	0.82	3.55	6.96	24.38	10.32	3.81	8.19	19.62	4.33

Tabelle 16

Rattenleber nach 60 Tagen Buttergelb-Fütterung: Prozentanteil der isolierten Nukleotide an $\sum E_{260\,m\mu}$ aller Fraktionen des Hauptchromatogramms

Versuch	Isolierte Nukleotide																
	DPN	CMP	AMP	HS	TPN	GMP	UMP	IMP	ADPR	ADP	UDPA	UDPGa UDPG	ADPRP	GDP	UDP	UDPGl	ATP	GTP UTP X
N			12.75							20.67	4.52	6.50					19.58	
O	1.29	0.70	13.20	0.19	0.57	2.28	4.15	0.78	0.63	18.36	4.01	5.61	2.06	1.60	3.06	4.75	21.87	4.75
P	3.10	1.08	13.35	0.19	0.89	2.36	4.93	1.01	0.76	19.56	5.50	4.34	2.06	1.75	2.36	4.65	17.40	3.90
$\bar{x}$	2.19	0.89	13.10	0.19	0.73	2.32	4.54	0.90	0.70	19.53	4.68	5.48	2.06	1.68	2.71	4.70	19.62	4.33
s	1.28	0.27	0.31	0	0.23	0.06	0.55	0.16	0.09	1.15	0.76	1.08	0	0.11	0.50	0.07	2.24	0.60
$\frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$	58.44	30.33	2.38	0	30.95	2.41	12.15	18.11	13.14	5.88	16.13	19.70	0	6.30	18.26	1.48	11.41	13.87

Tabelle 17

Rattenleber nach 100 Tagen Buttergelb-Fütterung:

Prozentanteil der Abschnitte des Hauptchromatogramms an $\Sigma E_{260\,m\mu}$ aller Fraktionen

Versuch	$E_{260\,m\mu}$		Abschnitte des Hauptchromatogramms									
	des Extraktes	aller Fraktionen	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Q		3649.7	27.28	0.95	4.90	8.70	22.69	10.60	3.97	6.03	12.50	2.33
R	5540.0	3345.9	22.41	0.65	4.15	8.40	26.05	10.12	3.96	6.60	15.50	2.20
S	5595.2	3481.1	28.59	1.19	5.62	8.23	24.35	9.36	4.65	6.42	9.31	2.24
Mittelwert	5567.6	3492.2	26.09	0.93	4.89	8.44	24.36	10.02	4.19	6.35	12.44	2.26

Tabelle 18

Rattenleber nach 100 Tagen Buttergelb-Fütterung: Prozentanteil der isolierten Nukleotide an $\sum E_{260\,m\mu}$ aller Fraktionen des Hauptchromatogramms

ersuch	Isolierte Nukleotide																
	DPN	CMP	AMP	HS	TPN	GMP	UMP	IMP	ADPR	ADP	UDPA	UDPGa UDPG	ADPRP	GDP	UDP	UDPGl	ATP	GTP UTP X
Q	2.04	1.01	21.60	0.25	1.14	3.27				17.46	3.78	6.63			1.16	4.25	12.50	2.33
R	2.35	0.86	16.65	0.11	0.88	2.92	5.60	1.01	1.02	20.60	3.78	6.34	1.98	1.73	0.98	4.97	15.50	2.20
S	3.38	0.71	21.40	0.21	1.00	4.01	4.26	2.10	1.27	19.13	4.18	5.18	2.24	1.97	0.79	4.95	9.31	2.24
$\bar{x}$	2.59	0.86	19.88	0.19	1.01	3.40	4.93	1.55	1.14	19.06	3.91	6.05	2.11	1.85	0.98	4.72	12.44	2.26
s	0.70	0.15	2.80	0.07	0.13	0.56	0.95	0.77	0.18	1.57	0.23	0.77	0.18	0.17	0.19	0.41	3.09	0.07
$\frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$	27.10	17.44	14.08	37.89	12.87	16.35	19.20	49.74	15.52	8.23	5.88	12.67	8.72	9.18	18.87	8.68	24.83	2.92

Tabelle 19

Rattenleber nach 150 Tagen Buttergelb-Fütterung:
Prozentanteil der Abschnitte des Hauptchromatogramms an $\Sigma E_{260 m\mu}$ aller Fraktionen

Versuch	$\Sigma E_{260 m\mu}$		Abschnitte des Hauptchromatogramms									
	des Extraktes	aller Fraktionen	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
T	4713.8	3456.5	22.37	1.37	5.18	7.95	21.87	9.92	4.55	6.43	17.54	2.79
U	5814.0	3726.3	22.75	1.05	4.44	7.41	24.75	8.56	4.62	7.43	15.54	3.42
V	5025.2	3864.1	20.45	1.17	4.08	5.06	24.10	8.30	4.78	7.56	20.62	3.83
Mittelwert	5184.3	3682.3	21.85	1.19	4.56	6.80	23.57	8.92	4.65	7.14	17.90	3.34

Tabelle 20

Rattenleber nach 150 Tagen Buttergelb-Fütterung: Prozentanteil der isolierten Nukleotide an $\sum E_{260\,m\mu}$ aller Fraktionen des Hauptchromatogramms

Versuch	Isolierte Nukleotide															
	DPN	CMP	AMP	HS	TPN	GMP	UMP	IMP	ADPR	ADP	UDPA	UDPGa UDPG	ADPRP	GDP	UDP	UDPGl	ATP	GTP UTP X
T	4.16	0.89	16.40	0.23	0.84	3.82	4.17		1.47	17.45	4.37	5.35	2.30	2.10	0.59	5.45	17.54	2.79
U	4.05	0.87	15.50	0.07	0.57	3.25	4.20	0.90		22.10	3.24	5.16	1.74	2.65	1.15	5.70	15.54	3.42
V	4.57	0.55	13.39	0.12	1.01	2.65	2.53	0.83	1.17	19.70	2.94	5.19	2.45	1.93	1.13	5.62	20.62	3.83
$\bar{x}$	4.26	0.77	15.09	0.14	0.80	3.24	3.63	0.86	1.32	19.75	3.51	5.23	2.16	2.22	0.95	5.59	17.90	3.34
s	0.27	0.19	1.54	0.08	0.22	0.59	0.96	0.05	0.21	2.32	0.75	0.10	0.38	0.38	0.32	0.13	2.56	0.52
$\frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$	6.43	24.80	10.20	58.57	27.75	18.05	26.32	5.81	16.06	11.74	21.48	1.95	17.36	16.93	33.47	2.28	14.30	15.68

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, daß - wie bei der regenerierenden Rattenleber - ein qualitativer Unterschied gegenüber dem normalen Gewebe nicht zu beobachten ist. Aus diesem Grunde beschränken wir uns auf die Wiedergabe des Hauptchromatogramms des Versuches P aus der Gruppe der 60 Tage lang mit Buttergelb gefütterten Tiere (s. Abb. 26).

Ein erster Überblick über das Diagramm zeigt, daß hier im Vergleich zum Elutiogramm der normalen Rattenleber quantitative Unterschiede vor allem in den Abschnitten IV, VI und VIII zu erwarten sind. Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei den Hauptchromatogrammen der Leberextrakte aus den 30, 100 und 150 Tage lang mit Buttergelb-Kost behandelten Ratten. Die Hauptchromatogramme werden jeweils in 10 Abschnitte unterteilt und, wie auf Seite 80 beschrieben, der Rechromatographie zugeführt. Die Identifizierung der einzelnen Nukleotide ergab analoge Werte, wie sie in Tabelle 2 auf Seite 20 aufgeführt sind.

Dagegen zeigen sich in quantitativer Hinsicht gegenüber der normalen Rattenleber markante Unterschiede. Die bei unseren Untersuchungen an 30, 60, 100 und 150 Tage mit Buttergelb gefütterten Tieren gefundenen quantitativen Werte sind in den vorstehenden Tabellen 13 - 20 zusammengestellt.

Bei den Adenosinphosphaten weicht der Gehalt an Mono- und Triphosphat bei allen Versuchen mit geschädigter Leber erheblich vom entsprechenden Prozentgehalt bei normalen Tieren ab. So ist AMP im 30-Tage-Versuch um 26,1% und nach 60tägiger Einwirkung des Cancerogens um 26,3% erniedrigt. Diese Abnahme ist in beiden Fällen signifikant ($p < 0{,}025$). Für die Gehaltsverringerung nach 150tägiger Behandlung um 15,1% sowie den zuvor auftretenden Anstieg an AMP um 11,8% nach 100 Tagen DAB-Kost können wir keine Signifikanz errechnen.

Die ADP-Werte stimmen bei allen Versuchen mit Buttergelb geschädigter Leber weitgehend überein. Keine der Abweichungen vom Normalwert beträgt mehr als 6%.

Hingegen treten bei ATP in allen Versuchsreihen wieder stärkere

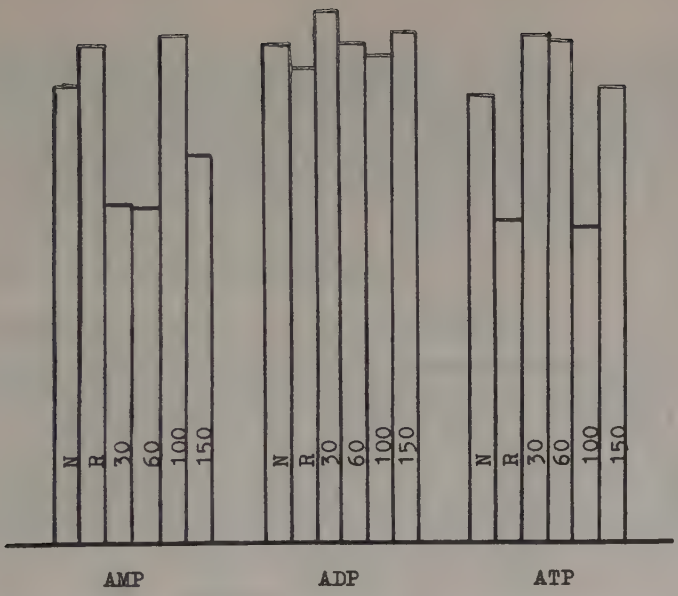


Abbildung 27: Vergleich der prozentualen Anteile des AMP, ADP und ATP an der Gesamtextinktion aller Fraktionen bei der normalen Rattenleber (N), dem regenerierenden Lebergewebe (R) und dem geschädigten Organ nach 30-, 60-, 100- und 150tägiger Einwirkung von Buttergelb.

Abweichungen gegenüber dem Gehalt im normalen Gewebe auf.

Interessanterweise sind gerade in den Versuchen, bei denen niedere AMP-Gehalte auftreten, die Werte für ATP erhöht und umgekehrt (vergl. Tab. 14, 16, 18 und 20). So ist der Anteil an ATP nach 30 Tagen um 13,4%, nach 60 Tagen um 11,9% und nach 150 Tagen um 2,1% erhöht, während er nach 100 Tagen um 29,0% unter die Norm sinkt.

Wie die obige Abbildung zeigt, ist eine kontinuierliche Änderung an AMP, ADP und ATP im Leberparenchym verschiedener Funktionszustände nicht festzustellen. Auffallend ist, daß die größte Abweichung des Gehaltes an AMP gegenüber der Norm bereits nach 30tägiger , bei ATP erst nach 100tägiger Schädigung des Organs auftritt.

Im Gesamtgehalt an Adenosinphosphaten ist ähnlich wie bei der regenerierenden Rattenleber bei den mit Buttergelb gefütterten Tieren eine geringfügige Erniedrigung zu beobachten. In den verschiedenen Versuchsreihen liegen die Werte für den Gehalt an AMP + ADP + ATP um 2,0% bis 6,3% niedriger als in der normalen Leber.

Tabelle 21

Prozentualer Anteil der Summe der Adenosinphosphate AMP + ADP + ATP an der Gesamtextinktion aller Fraktionen in den Versuchen der durch Buttergelb geschädigten Rattenleber.

30 Tage DAB-Kost	%-Summe AMP+ADP+ATP
Versuch K	50,5
L	55,3
M	55,5
$\bar{x}$	53,8
s	2,8
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	5,3%

60 Tage DAB-Kost	%-Summe AMP+ADP+ATP
Versuch N	53,0
O	53,4
P	50,3
$\bar{x}$	52,3
s	1,7
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	3,2%

100 Tage DAB-Kost	%-Summe AMP+ADP+ATP
Versuch Q	51,6
R	52,8
S	49,8
$\bar{x}$	51,4
s	1,5
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	2,5%

150 Tage DAB-Kost	%-Summe AMP+ADP+ATP
Versuch T	51,4
U	53,1
V	53,7
$\bar{x}$	52,7
s	1,2
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	2,3%

Obwohl die Summen der Prozentanteile von AMP + ADP + ATP in den einzelnen Versuchen von ihrem Mittelwert nur geringfügig abweichen, konnten wir doch nur bei der Untersuchung der 100 Tage lang behandelten Tiere eine signifikante Erniedrigung errechnen ($p < 0,05$). Der Gesamtgehalt an Adenosinphosphaten in den Versuchsreihen mit geschädigten Rattenlebern ist in der vorstehenden Tabelle 21 zusammengestellt.

Am deutlichsten treten die quantitativen Veränderungen des Gehaltes an löslichen Nukleotiden im geschädigten Organ bei den Uridinderivaten auf. Diese Tatsache findet ihren Ausdruck in einer starken Erhöhung des Gehaltes aller Uracilnukleotide. Die geringste Zunahme des prozentualen Anteils der Summe aller isolierten Uridinverbindungen tritt nach 30tägiger Buttergelb-Fütterung mit 14,2% auf. Zu einem wesentlich stärkeren Anstieg kommt es nach 60tägiger Einwirkung des Cancerogens. Hier beträgt die Vermehrung des Gehaltes an Uracilnukleotiden 49,1% und ist hochsignifikant ($p < 0,0005$). Nach 100 Tagen geht dieser Zuwachs auf 41,1% und bei 150 Tagen schließlich auf 30,2% zurück. Die nachfolgende Tabelle 22 zeigt, daß der Variationskoeffizient des prozentualen Anteils des Gesamtgehaltes an Uridinverbindungen im extremsten Falle (30-Tage-Versuch) bei 8,4% liegt. In dieser Versuchsreihe kann daher eine Signifikanz nicht erbracht werden. Die Werte für die Versuche mit 100 und 150 Tage lang behandelter Leber aber sind signifikant ($p < 0,125$) bzw. hochsignifikant ($p < 0,01$).

Die Betrachtung der einzelnen Komponenten ergibt, wie die Abbildung 28 auf Seite 70 veranschaulicht, im Falle des UMP einen Gehaltsanstieg, der nach 30tägiger Fütterung des Buttergelb-Gebäckes um 12,0% über der Norm liegt. Er nimmt dann im 60-Tage-Versuch auf 51,3% zu und erreicht schließlich mit 64,3% im 100 Tage geschädigten Organ sein Maximum. Diese beiden Werte erscheinen uns signifikant ($p < 0,025$). Nach 150 Tagen fällt der Zuwachs wieder auf 21,0% zurück.

Die starke Vermehrung an UMP im Verlaufe der Buttergelb-Schädi-

Tabelle 22

Prozentualer Anteil der Summe aller isolierten Uracilnukleotide an der Gesamtextinktion aller Fraktionen in den Versuchen der durch Buttergelb geschädigten Rattenleber.

30 Tage DAB-Kost	%-Summe Uracilnukleotide
Versuch K	18,2
L	16,1
M	15,5
$\bar{x}$	16,6
s	1,4
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	8,4%

60 Tage DAB-Kost	%-Summe Uracilnukleotide
Versuch O	21,6
P	21,8
$\bar{x}$	21,7
s	0,1
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	0,7%

100 Tage DAB-Kost	%-Summe Uracilnukleotide
Versuch R	21,6
S	19,4
$\bar{x}$	20,5
s	1,6
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	7,9%

150 Tage DAB-Kost	%-Summe Uracilnukleotide
Versuch T	19,9
U	19,5
V	17,4
$\bar{x}$	18,9
s	1,3
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	7,1%

gung stimmt mit dem Befund bei den Versuchen mit regenerierender Rattenleber überein, wo wir eine Erhöhung um 88,0% feststellen konnten.

Für UDP ergibt sich nach einer 18,2%igen Nukleotidvermehrung nach 30tägiger Schädigung des Leberstoffwechsels am 60. Versuchstag mit 251,9% ein hochsignifikanter Anstieg ($p < 0,0025$), auf den dann wieder mit 27,3% im 100-Tage-Versuch und mit 23,4% nach 150 Tagen eine Verkleinerung der Zuwachsrate folgt.

Ein Vergleich des Gehaltes an UDPA in normaler Leber und im Verlaufe der Buttergelb-Fütterung zeigt eine ähnliche Veränderung wie UDP. Auch hier ist die stärkste und zugleich signifikante Zunahme ($p < 0,0125$) mit 41,8% nach 60 Tagen zu verzeichnen, die dann mit 18,5% bei 100 Tagen auf einen gleichfalls signifikanten Wert absinkt ($p < 0,025$) um sich schließlich im 150-Tage-Versuch mit der geringen Zuwachsrate von 6,4% dem Normalwert wieder zu nähern. Auch der Anstieg an UDPA um 7,3% am 30. Tage der Fütterung liegt ähnlich wie bei UDP nahe am Normalwert.

Bei den beiden nicht voneinander getrennten Transportmetaboliten UDPG + UDPGa tritt nach einer anfänglichen Verminderung des Gehaltes um 6,8% im 30-Tage-Versuch ein langsamer Anstieg ein, der am 60. Tag nach der Verabfolgung der DAB-Kost um 2,6% über der Norm liegt und nach 100 Tagen mit 13,3% seinen Höchstwert erreicht. Nach 150 Tagen fällt der Gehalt wieder um 2,1% unter den Normalwert. Wie wir aus diesen Werten ersehen, bleibt der Gehalt an diesen beiden Transportmetaboliten auch nach längerer Einwirkung von 4-Dimethylaminoazobenzol annähernd konstant.

Dagegen ist die Zuwachsrate an UDPGl in allen Versuchsreihen sehr gewaltig. Das beginnt schon mit der signifikanten Vermehrung ($p < 0,025$) um 66,4% nach 30tägiger Dauer der Buttergelb-Behandlung. Der hochsignifikante Wert nach 60 Tagen DAB-Kost ($p < 0,0025$)weist auf eine Gehaltszunahme um 105,2% hin, die auch am 100. Tage mit 106,1% anhält, um dann im 150-Tage-Versuch mit 144,1% zu gipfeln. Auch die Werte für diese beiden letzten Versuchsreihen sind hochsignifikant ($p < 0,0025$ bzw. $p < 0,0005$).

Die Pyridinnukleotide DPN und TPN, sowie die Abbauprodukte ADPR und ADPRP der reduzierten Coenzyme DPNH und TPNH zeigen bei summarischer Betrachtung der Gehalte (Tab. 23) gegenüber dem normalen Gewebe vom 60. Tag der DAB-Behandlung an einen Abfall um 28,6%, der gleichzeitig die auffälligste Veränderung darstellt. Bei den 100-Tage-Versuchen tritt ebenfalls eine, wenn auch schwächere Verringerung um 11,2% auf. Nach 150 Tagen wächst

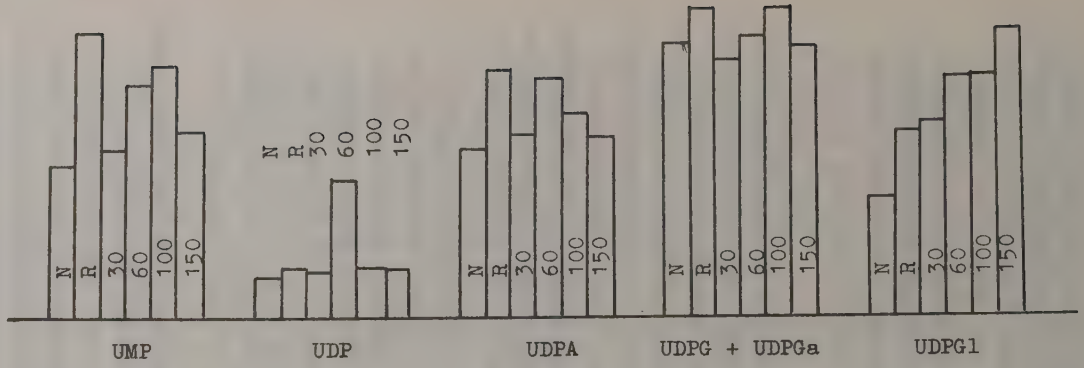


Abbildung 28: Vergleich der prozentualen Anteile der isolierten Uracilnukleotide an der Gesamtextinktion aller Fraktionen bei der normalen Rattenleber (N), dem regenerierenden Lebergewebe (R) und dem geschädigten Organ nach 30-, 60-, 100- und 150tägiger Einwirkung von Buttergelb.

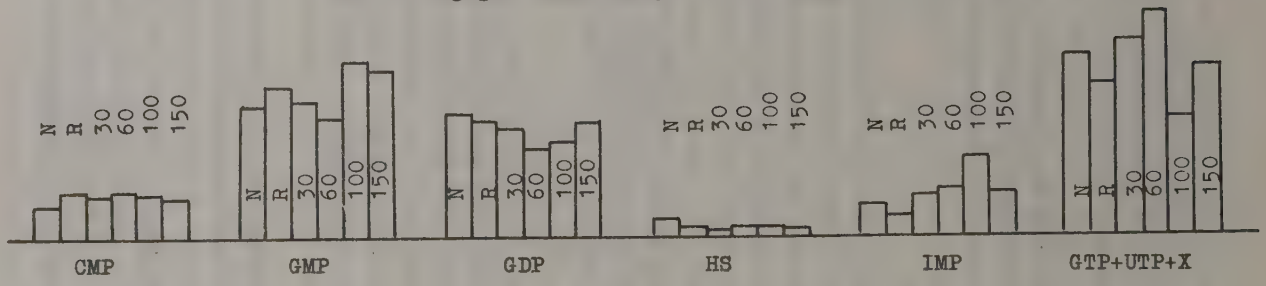


Abbildung 29: Vergleich der prozentualen Anteile von CMP, GMP, GDP, HS, IMP und GTP+UTP+X an der Gesamtextinktion aller Fraktionen bei der normalen Rattenleber (N), dem regenerierenden Lebergewebe (R) und dem geschädigten Organ nach 30-, 60-, 100- und 150tägiger Einwirkung von Buttergelb.

der Gehalt so mächtig an, daß eine hochsignifikante Vermehrung ($p < 0,01$) um 13,0% über den Normalwert beobachtet werden kann. Wie aus der nachfolgenden Tabelle 23 zu entnehmen ist, zeigt die Summe des Gehaltes an DPN + TPN + ADPR + ADPRP in den einzelnen Versuchsreihen starke Abweichungen vom Mittelwert. Der Variationskoeffizient beträgt bis zu 28,2% (60-Tage-Versuch). Eine Signifikanz läßt sich aus diesem Grunde und wegen der geringen Versuchsbreite mit Ausnahme des 150-Tage-Versuches nicht errechnen.

Tabelle 23

Prozentualer Anteil der Summe von DPN + TPN + ADPR + ADPRP an der Gesamtextinktion aller Fraktionen in den Versuchen der durch Buttergelb geschädigten Rattenleber.

30 Tage DAB-Kost	%-Summe DPN+TPN+ADPR+ADPRP
Versuch K	6,3
L	9,1
M	8,8
$\bar{x}$	8,1
s	1,5
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	18,6%

60 Tage DAB-Kost	%-Summe DPN+TPN+ADPR+ADPRP
Versuch O	4,6
P	6,8
$\bar{x}$	5,7
s	1,6
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	28,2%

100 Tage DAB-Kost	%-Summe DPN+TPN+ADPR+ADPRP
Versuch R	6,2
S	7,9
$\bar{x}$	7,1
s	1,2
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	16,6

150 Tage DAB-Kost	%-Summe DPN+TPN+ADPR+ADPRP
Versuch T	8,8
V	9,2
$\bar{x}$	9,0
s	0,3
$\frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	3,4

Betrachtet man die Nukleotide dieser Reihe getrennt voneinander, so fällt in Bezug auf DPN eine unbedeutende Zunahme des Gehaltes am 30. Tag der Fütterung von p-Dimethylaminoazobenzol auf. Sie beträgt nur 2,1%. Wie die Abbildung 30 auf Seite 73 weiterhin zeigt, sinkt nach 60tägiger DAB-Kost die Konzentration an DPN im Lebergewebe stark, d.h. um 42,1% ab. Dieser Wert ist signifikant ($p < 0,05$) und besonders deswegen von Interesse, da histologisch nach 60 Tagen eine maligne Entartung noch nicht nachweisbar ist. Für den Lebertumor nach Buttergelb-Fütterung ist eine Verringerung des Gehaltes an DPN und TPN schon beschrieben worden (8, 20, 25). Die Abnahme an DPN ist auch noch nach 100 Tagen mit 31,5% signifikant ($p < 0,025$), obwohl auch jetzt nur Cirrhosen und polymorphe Parenchymkerne im Gewebsschnitt beobachtet werden konnten. Erstaunlich ist der Versuchsbefund nach 150tägiger Behandlung mit DAB. Es ergibt sich nämlich jetzt eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) des DPN-Gehaltes um 12,7%.

Der TPN-Gehalt ist gegenüber der Norm, wie die Abbildung 30 zeigt, bei allen Versuchen mit DAB geschädigter Leber verringert. Nach 30 Tagen der Verabfolgung von buttergelbhaltiger Nahrung beträgt die Erniedrigung bereits 28,7%. Nach 60 Tagen liegt auch hier wieder - wie bei DPN - ein Minimum mit einer 43,4%igen Senkung vor. Für den 100-Tage-Versuch ergibt sich eine Abnahme von 21,7% und nach 150 Tagen eine solche von 38,0%.

Die Bestimmung von ADPR zeigt nach 30tägiger Behandlung mit dem Cancerogen einen Abfall um 16,7% gegenüber dem Gehalt im normalen Gewebe, nach 60 Tagen sinkt die Abnahme mit 35,2% auf einen hochsignifikanten Wert ($p < 0,01$). Bei den Versuchen an Ratten mit 100 Tage lang beeinflußtem Leberstoffwechsel tritt mit einer Zunahme an ADPR um 5,6% gegenüber der Norm wieder eine Normalisierung ein. Der 150-Tage-Versuch weist dann wieder - wie bei DPN - einen deutlichen Nukleotidanstieg um 22,2% gegenüber dem Normalgehalt auf.

Der Gehalt an ADPRP in Rattenlebern, die über verschiedene Zeiträume mit Buttergelb behandelt werden, liegt bei allen Versuchen

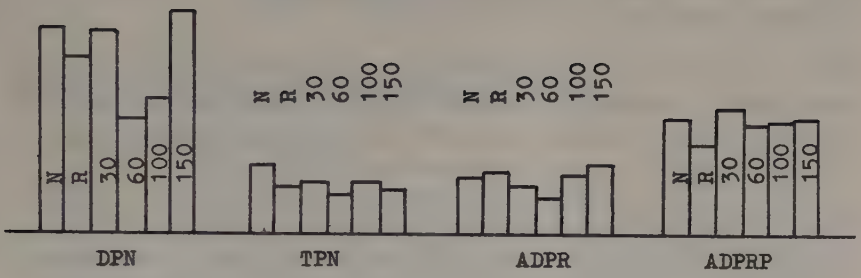


Abbildung 30: Vergleich der prozentualen Anteile des DPN, TPN, ADPR und ADPRP an der Gesamtextinktion aller Fraktionen bei der normalen Rattenleber (N), dem regenerierenden Lebergewebe (R) und dem geschädigten Organ nach 30-, 60-, 100- und 150tägiger Einwirkung von Buttergelb.

in der Größenordnung des Normalwertes. Leicht erhöht ist der Wert nach 30 Tagen mit 8,7%, während er nach 60 Tagen um 5,5%, nach 100 Tagen um 3,2% und nach 150 Tagen nur um 0,9% unter die Norm sinkt.

Bei GMP verändert sich der Gehalt gegenüber der normalen Rattenleber im 30-Tage-Versuch nicht, fällt aber nach 60 Tagen um 12,8% ab. Nach 100 Tagen erfolgt ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) mit 27,8% und bei 150 Tagen eine Zunahme um 21,8%.

Der Gehalt an GDP fällt gleichfalls bis zum 60. Tag der Fütterung laufend ab, nähert sich aber nach 150 Tagen wieder dem Normalwert. Im einzelnen macht die Erniedrigung nach 30tägiger Behandlung 11,0% aus, erreicht nach 60 Tagen mit 28,8% ein signifikantes Minimum ($p \approx 0,05$) und beträgt nach 100 Tagen immer noch 21,6%. Nach 150 Tagen liegt der Gehalt nur mehr um 5,9% unter dem Normalwert.

Das CMP zeigt bei allen Buttergelb-Versuchen eine beträchtliche Vermehrung im Gehalt gegenüber der unbehandelten Leber. Beim 30-Tage-Versuch steigt der prozentuale Anteil um 33,9%, nach 60 Tagen um 43,5%, nach 100 Tagen um 38,7% und nach 150 Tagen

um 24,2%. Eine Signifikanz können wir nur für den Wert des 100-Tage-Versuches angeben ($p < 0,025$).

Über die quantitative Veränderung der Harnsäure im geschädigten Organ lassen sich keine sicheren Angaben machen, da der Variationskoeffizient, der im extremsten Falle (30-Tage-Versuch) 113,1% beträgt, eine solche Betrachtung verbietet.

Ähnlich wie CMP steigt auch IMP bei allen Versuchen beachtlich an (s. Abb. 29). Dieser Konzentrationszuwachs nimmt mit einer Erhöhung um 29,3% über die Norm im Versuch mit Tieren, die 30 Tage lang die DAB-Kost erhielten, seinen Ausgang, erhöht sich nach 60 Tagen auf 55,2% und erreicht nach 100 Tagen mit 167,2% sein Maximum. Im 150-Tage-Versuch sinkt der Gehalt an IMP mit einer Zuwachsrate von 48,3% auf einen signifikanten Wert zurück ($p < 0,05$).

Die energiereichen Nukleotide GTP + UTP + X, die im letzten Abschnitt der Abbildung 29 zusammengefaßt sind, zeigen bei 30 und 60 Tage lang mit Buttergelb gefütterten Ratten einen Anstieg um 6,9% und 23,7% über den Gehalt bei normalen Tieren. Nach 100 Tagen tritt ein signifikanter Abfall ($p < 0,025$) um 35,4% auf, der nach 150 Tagen nur noch 4,6% unter der Norm liegt.

D. Experimenteller Teil

I) Methode der Ionenaustauschchromatographie

1) Vorbereitung der Säule

Für die Ionenaustauschchromatographie benützen wir zwei Säulengrößen. Der Hauptversuch erfolgt mit einer 50 cm langen Glassäule von 1 cm Durchmesser und einer Füllhöhe von 31 cm, die Rechromatographie wird mit 35 cm langen, etwa 24 - 27 cm hoch gefüllten Säulen von 0,8 cm Durchmesser ausgeführt. Alle Säulen sind am unteren Ende mit einer Glassinterplatte G 2, die mit Glaswolle belegt ist, und mit einem Glashahn versehen.

Als Ionenaustauscher verwenden wir Dowex 1 (Chlorid) X-10, 200 - 400 mesh, den wir nicht in der käuflichen Chloridform sondern als Formiat einsetzen. Zu diesem Zweck wird der Harzaustauscher auf einer Nutsche durch Waschen mit 80%iger Ameisensäure vorbehandelt. Dabei geht ein großer Teil des Ionenaustauschers in die Formiatform über. Durch das Auswaschen werden darüber hinaus Verunreinigungen, die durch ihre starke UV-Absorption Störungen im Analysengang hervorrufen, sowie die kleineren Körnchen des Pulvers entfernt. Das so vorbehandelte Austauscherharz gießt man als Aufschwemmung, die aus 1 Volumen-Teil Dowex 1 und 2 Volumen-Teilen einer Lösung von 6 Mol HCOOH und 1 Mol $HCOONH_4$ im Liter besteht, in einem Zuge bis zum oberen Rand in die Säule und läßt absitzen. Der sich sedimentierende Austauscher ballt sich zu einer festen Harzsäule zusammen. Wenn die gewünschte Füllhöhe erreicht ist, schüttet man die darüber stehende Aufschwemmung ab und wäscht die Säule zunächst mit einer Wassermenge nach, die dem dreifachen Volumen der Harzsäule entspricht. Dann bringt man etwas Glaswolle auf die Säule und wäscht solange mit einer Mischung aus 6 Mol HCOOH und 1 Mol $HCOONH_4$ im Liter, bis im Auslauf keine Chloridionen mehr nachweisbar sind. Die Säule wird nun mit 1 Liter doppelt destilliertem Wasser eluiert und anschließend erneut mit der Mischung aus

Ameisensäure und Ammoniumformiat solange gewaschen, bis die bei 260 mμ und 275 mμ gemessene Extinktion des Durchflusses im Spektralphotometer mit der Waschflüssigkeit übereinstimmt. Schließlich lassen wir soviel über Quarz destilliertes Wasser durch die Säule fließen, bis das Eluat nicht mehr sauer reagiert und bei 260 mμ und 275 mμ gegen Wasser die Extinktion 0 hat. Nach dieser Behandlung ist die Säule einsatzbereit.

Die Waschflüssigkeiten werden mittels hydrostatischem Druck, den man am einfachsten aus zwei Abklärflaschen mit einem Niveauunterschied von mindestens 1,5 m erhält, durch die Säulen gepreßt.

Benützte Säulen können nach dem oben beschriebenen Verfahren regeneriert und für weitere Versuche verwendet werden.

2) Bereitung des Extraktes

Die Herstellung des sauren Nukleotidextraktes erfolgt bei allen Versuchen aus 48 g Leberparenchym weißer Sprague-Dawley-Ratten von etwa 200 g Körpergewicht. Bei den Versuchen mit normaler und maligner Rattenleber gehen wir von 8 Tieren aus, bei Untersuchungen des Regenerationswachstums von 16 Ratten, die etwa 43 - 46 Stunden nach der Hepatektomie (ca. 60% des Organgewichtes werden entnommen) aufgearbeitet werden.

Nach Dekapitierung der Versuchstiere bringt man das Lebergewebe möglichst rasch (20 - 40 Sekunden) in flüssigen Stickstoff. 48 g der eingefrorenen Organe werden dann in einem Mörser grob zerstoßen und ohne aufzutauen in 2 Portionen mit je 50 ml 0,5 n Perchlorsäure in einem Bühler-Homogenisator 3 Minuten lang extrahiert. Dabei hält man die Temperatur im Schutzbecher des Gerätes mit einer Mischung aus Trockeneis und 50%igem Äthanol ungefähr auf - 10° bis - 15°. Das Homogenisat zentrifugieren wir in einer Spinco-Ultrazentrifuge unter Kühlung 30 Minuten mit 22000 g. Der Rückstand wird 3 Minuten lang mit 60 ml 0,3 n Perchlorsäure bei ca. - 15° der Kühlbadtemperatur suspendiert und erneut unter den obengenannten Bedingungen zentrifugiert. Die

beiden Überstände vereinigt man und neutralisiert sie mit 30%iger Kalilauge gegen Phenolrot (etwa pH 6,8) als Indikator. In einer Tiefkühltruhe läßt man das gebildete Kaliumperchlorat absetzen und zentrifugiert schließlich nochmals 20 Minuten mit 22000 g. Der so erhaltene Extrakt wird nach Bestimmung der Extinktion bei 260 mμ gegen Wasser auf die Säule aufgetropft. Mit Wasser waschen wir dann solange nach, bis das Eluat bei 260 mμ keine Extinktion mehr aufweist. Den gesamten Säulenauslauf vereinigen wir und messen seine Extinktion. Durch Subtraktion dieses Wertes von dem vorhin erhaltenen läßt sich die Gesamtextinktion der Nukleotide des Extraktes errechnen (s. zweite Spalte der Tab. 3, 8, 13, 15, 17, 19).

3) Elution

Die Elution erfolgt durch kontinueirlichen Anstieg der Säurekonzentration nach dem von R.B. Hurlbert und Mitarbeitern angegebenen Verfahren (24).

Die dabei verwendete Apparatur (Abb. 31) besteht aus einer Saugflasche B, welche die Elutionsflüssigkeit enthält, und aus einem Mischgefäß C mit Magnetrührer. Die Gefäße sind mit Gummistopfen und Polyaethylenschläuchen miteinander verbunden. Der hydrostatische Druck zweier Abklärflaschen (A_1 und A_2), mit einem Niveauunterschied von 1,5 m, preßt die Elutionsflüssigkeit aus der Reservoirflasche B langsam in das Mischgefäß C und zwar in dem Maße, wie aus diesem Flüssigkeit auf die Ionenaustauschsäule tropft. Der Zufluß wird in der Mischflasche durch ein magnetisches Rührwerk gemischt. Die Konzentration des Elutionsmittels C_E in der Zuleitung zur Harzsäule berechnet sich nach der Formel (24):

$$C_E = C_R \cdot \frac{\text{Antilog.} \frac{x}{2{,}3\ V} - 1}{\text{Antilog.} \frac{x}{2{,}3\ V}}$$

C_E = Konzentration des Elutionsmittels
C_R = Konzentration der Säure im Reservoir
x = Menge an verbrauchter Elutionsflüssigkeit
V = Flüssigkeitsvolumen in der Mischflasche.

Zu Beginn der Elution füllt man das Mischgefäß mit 500 ml Wasser und das Reservoir mit 4n HCOOH. Bei Fraktion 125 wird die Elutionsflüssigkeit des Reservoirs gegen eine Lösung ausgetauscht, die 4 Mol HCOOH + 0,2 Mol $HCOONH_4$ im Liter Wasser gelöst enthält. Diese ersetzen wir dann bei Gefäß 205 durch eine Mischung aus 4 Mol HCOOH + 0,4 Mol $HCOONH_4$ im Liter Wasser und schließlich bei Fraktion 285 durch eine aus 4 Mol HCOOH + 0,8 Mol $HCOONH_4$ pro Liter Wasser zusammengesetzte Flüssigkeit. Bei jedem

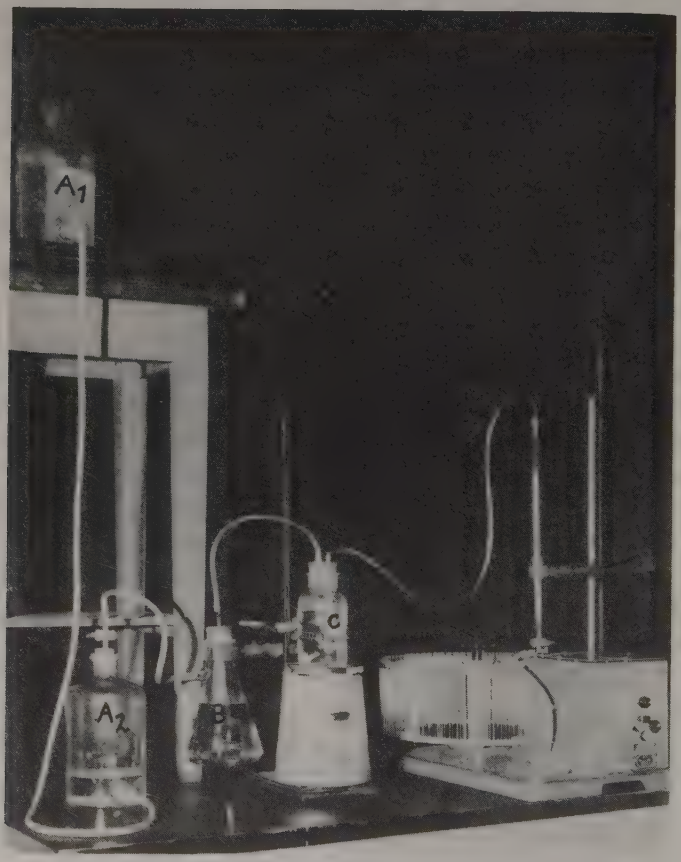


Abbildung 31: Apparatur zur Ionenaustauschchromatographie.

Wechsel des Elutionsmittels wird das Niveau der Abklärflaschen wieder in die Ausgangshöhe gebracht.

Die Trennung des aus der Säule abtropfenden Eluats erfolgt in Fraktionen von 4,5 ml mit Hilfe des Fraktomat Y-2 der Firma Wagner & Munz, München. Die Auslaufgeschwindigkeit wird auf 4 ml / 10 Minuten eingestellt. Alle Fraktionen werden bei 260 mμ und 275 mμ gegen Wasser gemessen. Die Addition dieser bei 260 mμ erhaltenen Werte unter Berücksichtigung des Volumens der Fraktionen ergibt die Gesamtextinktion ΣE_{260} aller Fraktionen, die in der dritten Spalte der Tabellen 3, 8, 13, 15, 17, 19 aufgeführt ist. Der Quotient $\frac{E\ 275}{E\ 260}$ ist ein brauchbarer Anhaltspunkt für die weitere Trennung und Identifizierung der Nukleotide. Unter den Bedingungen dieses Verfahrens liegen die Quotienten für Adenosin- und Inosin-Phosphate bei 0,4, für Guaninnukleotide bei 0,7, für Uracilverbindungen bei 0,6 und für Cytosinderivate über 1,0. Durch die unvollständige Trennung der Verbindungen im Hauptchromatogramm sowie durch die pH-Abhängigkeit der Quotienten sind die Werte gewissen Schwankungen unterworfen.

Bei der graphischen Darstellung der Extinktionswerte der Fraktionen des Hauptchromatogramms zeigt sich, daß die meisten der dabei auftretenden Gipfel mehr oder weniger heterogen sind, d.h. sie enthalten mehr als nur eine Verbindung. Aus diesem Grunde unterteilen wir das Hauptchromatogramm unter Berücksichtigung des Quotienten $\frac{E\ 275}{E\ 260}$ in 10 Abschnitte. Die Fraktionen, die diesen Banden entsprechen, werden vereinigt und einer nochmaligen Chromatographie unterworfen. Zu diesem Zweck muß das Lösungsmittel entfernt werden. Wegen der Labilität der Verbindungen bedient man sich zur Entfernung der Ameisensäure der Gefriertrocknung. Bei den Fraktionen 130 - 450 enthält das Elutionsmittel neben Ameisensäure auch noch Ammoniumformiat, das sich nur zu einem geringen Teil auf diese Weise entfernen läßt. Man überführt daher die nach der Gefriertrocknung verbleibenden Rückstände der Abschnitte V - X des Hauptchromatogramms in 50 ml fassende Erlenmeyer-Kölbchen und friert sie in gleichmässiger Schicht an der Wandung ein. Die Kölbchen bringen wir in

einen Exsiccator, dessen seitlicher Tubus über ein ungefähr 25 cm langes Glasrohr von 2 cm Durchmesser mit der Kühlfalle einer Gefriertrocknungsanlage verbunden ist. Nach erfolgter Trocknung der Proben wird der Exsiccator durch eine Infrarotlampe schwach erwärmt (ca. 40°). Dabei sublimiert das Ammoniumformiat aus den Kölbchen in die Kühlfalle und an die Exsiccatorwand.

4) Rechromatographie

Die nach der Gefriertrocknung und dem Entfernen des Ammoniumformiats verbleibenden Rückstände der Abschnitte I - X des Hauptchromatogramms nimmt man in wenig 0,01 n Salzsäure auf, bringt sie mit 0,1 n Natronlauge gegen Merck-Indikatorpapier auf pH 6,5 und adsorbiert sie schließlich an die für die Rechromatographie bestimmten Ionenaustauschersäulen. Bei der nun folgenden Trennung arbeiten wir mit der gleichen Versuchsanordnung wie beim Hauptchromatogramm, eluieren aber jetzt mit Ammoniumformiat (pH 5 - 4) unter langsamem Konzentrationsanstieg. Dazu füllt man die Reservoirflasche bei allen Rechromatographieversuchen zunächst mit 1 n $HCOONH_4$ und die Mischflasche der Versuche R_1 - R_4 mit 500 ml Wasser. Bei der Rechromatographie des Abschnitts V enthält die Mischflasche nur 400 ml Wasser. Für die Elutiogramme R_6 - R_8 wird das Rührgefäß nur mit 350 ml Wasser, für R_9 mit 300 ml und schließlich für R_{10} mit 250 ml Wasser gefüllt. Ab Fraktion 80 ist das Reservoirgefäß der Rechromatographieversuche R_5 und R_7 - R_9 gegen 2 n $HCOONH_4$ auszuwechseln. Bei der Rechromatographie des Abschnitts X wird die 1 n $HCOONH_4$ ab Fraktion 55 durch 2 n $HCOONH_4$ und ab Fraktion 100 durch eine Lösung aus 2 Mol $HCOONH_4$ + 0,75 Mol HCOOH auf 1 Liter Wasser ersetzt.

Die Trennung des Eluats in Fraktionen zu 4,3 ml erfolgt bei den Rechromatogrammen mit Hilfe zweier Fraktionsteiler ("Chromatopart", Firma Dr. Bender & Dr. Hobein, München). Die Extinktion mißt man ähnlich wie im Hauptchromatogramm bei den Wellenlängen 260 mμ und 275 mμ.

Durch die verschiedene Ladung der Nukleotide untereinander in Säure und Pufferlösung ergibt sich bei der Rechromatographie eine andere Reihenfolge ihres Erscheinens als im Hauptchromatogramm.

Wegen der schwierigen und umständlichen Entfernung des Lösungsmittels vor allem aber des NH_4^+Ions ist dieses Verfahren trotz der guten Trennungsmöglichkeiten für eine routinemäßige Analyse nur bedingt geeignet.

II) Routineanalysen

Diejenigen Fraktionen eines jeden Rechromatogramms, die einen annähernd gleichen Extinktionsquotienten haben, werden zusammengegeben, gefriergetrocknet und von Ammoniumformiat befreit. Die dabei verbleibenden Rückstände führen wir folgenden Bestimmungen zu:

1) Spektralphotometrie

Von erstmalig isolierten Verbindungen nehmen wir im Beckmann Spektralphotometer Modell DU bei pH 2 das Gesamtspektrum von 220 - 290 mμ auf und versuchen dieses auf Pergamentpapier aufgetragene Diagramm mit dem einer Vergleichssubstanz zur Deckung

Tabelle 24

UV-Charakteristika der untersuchten Nukleotide.

	UV-Absorption									
	Wellenlänge		E bei gegebener Wellenlänge / E des max. bei pH 2						E280/E260	E250/E260
Nukleotide	max.	min.	max.	min.	230	245	260	275		
Adenosinphosphat										
pH 2	258	228	1,00	0,21	0,24	0,63	0,98	0,40	0,22	0,85
pH 12	260	230	1,04		0,24	0,60	1,04	0,38		
Cytidinphosphat										
pH 2	280	241	1,00	0,12	0,26	0,13	0,50	0,97	2,00	0,46
pH 12	273	251	0,70	0,48	0,62	0,50	0,56	0,67		
Guanosinphosphat										
pH 2	256	228	1,00	0,22	0,24	0,73	0,96	0,69	0,68	1,01
pH 12	265	231	0,93	0,35	0,36	0,65	0,93	0,80		
Uridinphosphat										
pH 2	261	230	1,00	0,22	0,22	0,56	0,99	0,61	0,34	0,74
pH 12	261	242	0,78	0,55	0,74	0,57	0,77	0,45		
Inosinphosphat										
pH 2	249	222	1,00	0,28	0,42	0,95	0,71	0,20	0,15	1,40
pH 12	254	226	1,17	0,35	0,40	0,96	1,05	0,44		

zu bringen. Als Vergleich dienen uns die von G.H. Beaven, E.R. Holiday und E.A. Johnson (3) zusammengestellten Kurven.

In Parallelversuchen begnügen wir uns mit den in der Tabelle 24 angegebenen Verhältniszahlen zweier Extinktionswerte zur Identifizierung des Stoffes. Diese Quotienten sind für die verschiedenen Nukleosidphosphate charakteristisch. Da sich die Mono-, Di- und Triphosphate nur sehr gering in ihrer UV-Absorption unterscheiden, gelten die UV-Charakteristika eines Nukleosidphosphates für alle drei Phosphatderivate. Dazu messen wir die zu analysierende Substanz in 0,1n HCl und 0,1n NaOH gegen das entsprechende Lösungsmittel bei den Wellenlängen 230, 245, 250, 260, 275 und 280 mμ . Ebenso werden das Maximum und das Minimum der Verbindung bei pH 2 und pH 12 bestimmt.

Die Werte für Inosinphosphat bestimmten wir mit authentischer Substanz der Firma Boehringer & Söhne, G.m.b.H., Mannheim . Für die übrigen Verbindungen entnehmen wir die Verhältniszahlen $\frac{E\ 280}{E\ 260}$ und $\frac{E\ 250}{E\ 260}$ den Arbeiten von H. Schmitz (52) und die restlichen Quotienten der Veröffentlichung von H. Schmitz, R.B. Hurlbert und V.R. Potter (55).

Zur quantitativen Bestimmung bei den Wellenlängen maximaler Absorption in 0,1n HCl benützen wir folgende millimolaren Extinktionskoeffizienten ($\varepsilon_{max.} \cdot 10^{-3}$): Adenosin 14,1 (258 mμ); Guanosin 13,3 (256 mμ); Inosin 13,2 (250 mμ); Uridin 9,9 (260 mμ) und Cytidin 13,7 (278 mμ) (16, 24). Aus dem Produkt der Extinktion im Maximum der Untersuchungslösung bei pH 2 und dem Volumen läßt sich durch Division mit diesen Koeffizienten die Mol-Menge bestimmen:

$$C_{Mol \cdot 10^{-3}} = \frac{E_{max}}{\varepsilon_{max.} \cdot l} \cdot \text{Volumen}$$

l = Schichtdicke der Küvette = 1 cm

2) Phosphatbestimmung

Die Phosphatbestimmung erfolgt kolorimetrisch in der modifizierten Form nach K. Schriever und Mitarbeitern (59):

a) Standard- und anorg. Phosphat:
Man gibt zu 2 ml der Untersuchungslösung (bei Aufstellung der Eichkurve zu 2 ml der jeweiligen Verdünnung) 0,1 ml 95 - 97%ige H_2SO_4, dann aus einer Bürette 3 ml Molybdänschwefelsäure, schüttelt um und versetzt mit 6 ml Wasser. Nach sorgfältigem Mischen wird der Ansatz in einen Thermostaten von 37° gebracht und nach 10 Minuten Vorwärmzeit mit 1 ml Reduktionsmittellösung versetzt. 20 Minuten nach Zugabe des Entwicklers (unter Beibehaltung der Reaktionstemperatur von 37°) erfolgt die Messung der Transmittance bei 660 mμ im Beckmann Spektralphotometer DU. Zur Aufstellung der Eichkurve wird die Absorption (Absorption = 100 - Transmittance) auf Lange-Kolorimeterpapier aufgetragen (s. Abb. 32).

b) Labiles Phosphat:
Man gibt zu 2 ml der Untersuchungslösung 0,1 ml 95 - 97%ige H_2SO_4 und bringt den Ansatz 15 Minuten lang in ein siedendes Wasserbad. Dann läßt man abkühlen, gibt 3 ml Molybdänschwefelsäure zu und ergänzt mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11,1 ml. Darauf stellt man den Ansatz 10 Minuten in einen Thermostaten von 37° und verfährt im übrigen wie unter a).

c) Gesamtphosphat:
Man gibt zu 0,5 ml der Untersuchungslösung 0,1 ml 95 - 97%ige H_2SO_4 und 2 Tropfen 65%iger HNO_3 und erhitzt in einem Ölbad auf 160°. Nach dem Abkühlen setzt man 2 ml Wasser zu, dann 3 ml Molybdänschwefelsäure und schließlich 6 ml Wasser. Der Ansatz wird dann in einen Thermostaten von 37° gebracht und wie unter a) weiterbehandelt.

Der hierbei erhaltene Wert muß mit 4 multipliziert werden.

Der Phosphatgehalt wird nach der Formel berechnet:

$$C_{Mol.10^{-6}PO_4^-} = \frac{E_{660}}{\varepsilon_{660}} \qquad \varepsilon_{660} = 0{,}298$$

Zur Aufstellung der Eichkurve dient eine Lösung von 0,4393 g KH_2PO_4 in 1 l Wasser. 1 ml dieser Lösung enthält 100 γ P.

Die Molybdänschwefelsäure bereitet man durch Auflösen von 4 g Natriummolybdat in 100 ml 5n Schwefelsäure.

Zur Herstellung des Reduktionsmittels löst man 75 g Natriumpyrosulfit, 5 g Natriumsulfit und 135 mg 2-Hydroxy -1-amino-naphtalin-sulfonsäure in 800 ml destilliertem Wasser. Sodann

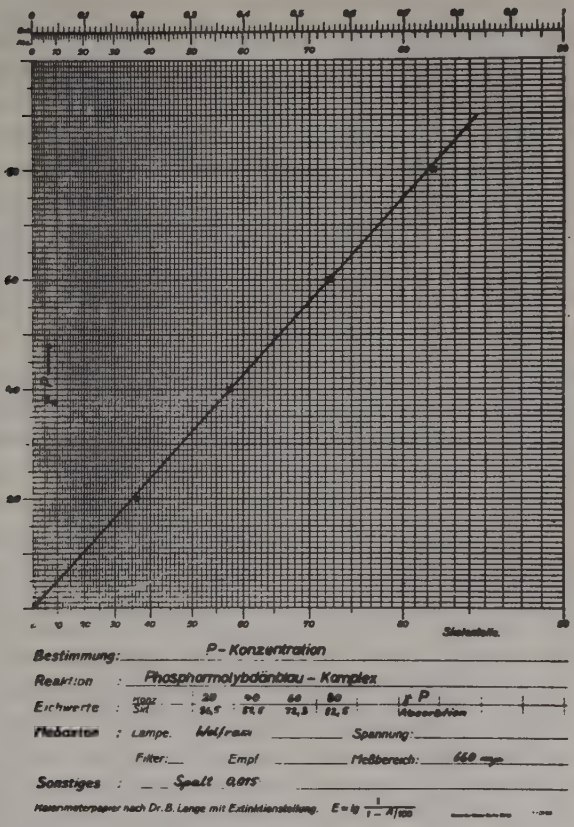


Abbildung 32: Eichkurve zur P-Bestimmung.

gibt man eine Lösung von 3,4 g 1-amino-naphtalin-4-sulfonsaurem Natrium in 100 ml destillierten Wassers zu und füllt auf 1 l auf.

3) Ribosebestimmung

Den Riboseanteil bestimmen wir kolorimetrisch mit der von C.P. Barnum und Mitarbeitern (2) modifizierten Methode von W. Mejbaum (37):
2 ml der Untersuchungslösung werden mit 4 ml eines frisch bereiteten Reagenzes aus 0,4% Orcin und 0,04% $FeCl_3$ in 36%iger HCl versetzt. Nach dem Durchmischen schmelzen wir die Reagenzröhrchen zu und erhitzen sie bei Adenosin- und Guanosinverbindungen 15 Minuten im siedenden Wasserbad. Bei Uridinverbindungen verbleiben sie 1 Stunde im kochenden Wasser. Nach dem Abkühlen erfolgt die Messung der Extinktion der grüngefärbten Lösung gegen den Leerwert bei 660 mμ im Spektralphotometer. Als Eichwert dient uns für Adenosinverbindungen eine Lösung von AMP, für Guanosinderivate GMP und für Uracilnukleotide UMP. Cytosinverbindungen kommen nicht zur Bestimmung.

Da die Pyrimidinnukleotide unter den angegebenen Bedingungen nur sehr schwache Farbreaktionen geben, weichen die errechneten Werte stark von denen der Purinnukleotide ab. Es ist daher nötig, für jede Nukleosidreihe eine eigene Eichkurve aufzustellen.

4) Papierchromatographie

Zur Sicherung unserer analytischen Ergebnisse unterziehen wir alle isolierten Nukleotide der Rechromatographie einer aufsteigenden eindimensionalen Papierchromatographie in zwei verschiedenen Laufmitteln. System I besteht aus einer 0,1m Phosphatpufferlösung (pH 6,8), die 600 g Ammoniumsulfat und 20 ml Propanol enthält. System II besteht aus Isobuttersäure: conc. Ammoniak:H_2O (66:1:33) (pH 3,7) (42). Wir arbeiten dabei mit ausgewaschenem Papier 2043 b der Firma Schleicher & Schüll bei einer Laufzeit von 20 Stunden in beiden Systemen. Die Eintauchtiefe

Tabelle 25

R_F-Werte der untersuchten Verbindungen im System I: 0,1m Phosphatpuffer/Ammonsulfat/Propanol (10:6g:0,2) und System II: Isobuttersäure/conc. Ammoniak/Wasser (66:1:33).

Substanz	R_F-Werte in System I	R_F-Werte in System II
Adenin	0,09	0,88
Adenosin	0,08	0,74
AMP	0,21	0,44
AMP-3'	0,10	0,51
ADP	0,26	0,30
ADPR	0,26	0,23
ATP	0,31	0,21
Guanin	0,11	0,36
Guanosin	0,21	0,34
GMP	0,35	0,18
GDP	0,43	0,08
GTP	0,47	0,05
Cytosin	0,53	0,61
Cytidin	0,54	0,52
CMP	0,66	0,32
CDP	0,73	0,17
CTP	0,81	0,09
Uracil	0,44	0,52
Uridin	0,52	0,33
UMP	0,64	0,19
UDP	0,72	0,09
UTP	0,77	0,06
IMP	0,48	0,18
DPN	0,21	0,39
TPN	0,37	0,20
FAD	0,0	0,33
Harnsäure	Schwanzbildung	0,31
Orotsäure	Schwanzbildung	0,28

beträgt 1 cm. Alle Chromatogramme werden jeweils vor Beginn der papierchromatographischen Trennung 2 Stunden dem Dampf des Lösungsmittels in der Trennkammer ausgesetzt.

Trotz der Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen mit Ausnahme eventueller Temperaturschwankungen konnten wir keine exakt reproduzierbaren R_F-Werte erzielen. Es ist daher notwendig, immer Vergleichssubstanzen mitlaufen zu lassen. Die in den Tabellen aufgeführten R_F-Werte sind die Mittelwerte aus mindestens fünf Bestimmungen und stellen wegen der teilweise großen Schwankungen ihrer Komponenten nur Anhaltsgrößen dar.

Die Uracilverbindungen werden darüber hinaus noch in einem weiteren Laufmittel papierchromatographisch untersucht. System III setzt sich zusammen aus Äthanol und 1m Ammoniumacetatpuffer pH 7,5 (7,5:3) (34). Die Laufzeit beträgt 24 Stunden. Das Papier und die übrigen Bedingungen entsprechen denen von System I und II, jedoch ist hier die Streuung der R_F-Werte wesentlich geringer.

Tabelle 26

R_F-Werte der Uracilverbindungen im System III: Äthanol/1m Ammoniumacetatpuffer pH 7,5 (7,5:3).

Substanz	R_F-Werte in System III
Uracil	0,68
Uridin	0,67
UMP	0,19
UDP	0,10
UDPG UDPGa	0,26
UDPA	0,32
UTP	0,05

Nach der Hydrolyse der Verbindungen werden die Basen der nicht eindeutig identifizierten Nukleotide im System IV (67): Isopropanol/ conc. HCl/Wasser (170:41:39) chromatographiert. Die Laufzeit beträgt 30 Stunden.

Tabelle 27

R_F-Werte der Basen und Nukleoside im System IV: Isopropanol/ conc. HCl/H_2O (170:41:39).

Substanz	R_F-Werte in System IV
Adenin	0,28
Adenosin	0,30
Guanin	0,19
Guanosin	0,28
Uracil	0,67
Uridin	0,64
Cytosin	0,44
Cytidin	0,45
Thymin	0,79
Thymidin	0,87

Zur Hydrolyse der Purinnukleotide erhitzt man diese in 1n HCl 1 Stunde lang auf 100° (60). Die Pyrimidinverbindungen werden unter denselben Bedingungen in 98%iger $HClO_4$ gespalten (36).

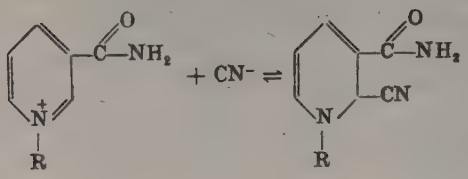
Die Sichtbarmachung der Flecke auf dem Papierchromatogramm erfolgt durch das Photoprintverfahren (35). Dieses beruht auf der spezifischen Absorption von UV-Licht durch Purine und Pyrimidine. Das getrocknete Chromatogramm wird über das auf einem konvex gebogenen Holzbrett befestigte Kopierpapier gespannt und mit der Lichtquelle - einer Quecksilberniederdrucklampe (Firma Hanau), die vornehmlich Licht der Wellenlänge 254 mμ emitiert - belichtet.

III.) Einzelbestimmungen

Nach den vorstehenden Routineanalysen schließen sich bei den folgenden Nukleotiden weitere Untersuchungen an:

1) DPN und TPN

S. Colowick und Mitarbeiter (13) zeigten, daß N-substituierte Nikotinamidverbindungen mit Cyanid reagieren können und daß die dabei entstehenden Verbindungen andere UV-Charakteristika besitzen als die Ausgangssubstanz.



Diese Erscheinung nützt man zur Bestimmung von DPN und TPN folgendermaßen aus: 0,5 ml der Substanzlösung werden mit 3 ml 1 m KCN-Lösung (pH 11) versetzt und im Beckmann Spektralphotometer DU gegen eine Mischung aus 0,5 ml Wasser und 3 ml KCN-Lösung gemessen.

Während DPN und TPN bei pH 2 gemessen sonst ein Maximum bei 258 mμ und ein Minimum bei 232 mμ haben, zeigen sie jetzt als Cyanid-Verbindungen ein Maximum bei 260 mμ und ein weiteres Maximum bei 325 mμ. Zur quantitativen Bestimmung ist $\varepsilon_{max.}$ DPN = 6,3 und $\varepsilon_{max.}$ TPN = 6,6 einzusetzen.

DPN und TPN lassen sich ferner auch durch eine enzymatisch-optische Bestimmung erfassen (38). Man löst die auf DPN zu untersuchende Substanz in 3 ml 0,2 m Phosphatpuffer (pH 7,6), gibt 0,6 ml 50%igen Äthanol, der 0,05 m Semicarbazid enthält, zu und versetzt schließlich mit 0,02 ml einer 2,5%igen Alkohol-Dehydrogenasesuspension. Nach 10 Minuten mißt man in 10 mm Küvetten die Extinktion bei 340 mμ gegen den Leerwert. Die Konzentration

an μ-Mol DPN errechnet sich aus der Formel:

$$C_{Mol \cdot 10^{-6}\,DPN} = \frac{E_{340}}{6,22} \cdot 3,62$$

Zur TPN-Bestimmung lösen wir die Substanz in 2,5 ml 0,05m Tris-Puffer (pH 7,4), geben 0,2 ml 0,1m $MgCl_2$-Lösung und 0,1 ml einer 0,1m Glucose-6-phosphatlösung zu. Darauf wird 0,1 ml einer 0,2%igen Suspension von Glucose-6-phosphat-dehydrogenase einpipettiert. Die Messung erfolgt in gleicher Weise wie bei DPN, die Berechnung hingegen nach der Formel:

$$C_{Mol \cdot 10^{-6}\,TPN} = \frac{E_{340}}{6,22} \cdot 2,9$$

2) UDPG + UDPGa

Den im Rechromatogramm VI mit UDPG und UDPGa bezeichneten Gipfel unterziehen wir nach der Gefriertrocknung einer vorsichtigen Hydrolyse (7). Man nimmt die Substanz in 0,01n HCl auf und erhitzt 5 Minuten im siedenden Wasserbad. Dabei wird neben UDP Glucose und Galaktose frei.

Ein qualitativer Nachweis ist papierchromatographisch (46) im System VI Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) möglich. Wie aus Tabelle 28 zu ersehen ist, laufen die beiden Hexosen hier annähernd gemeinsam. In einem weiteren Laufmittel, System V, bestehend aus wassergesättigtem Phenol, ist eine bessere Trennung möglich. Wir arbeiten mit Papier 2043b der Firma Schleicher & Schüll. Die Laufzeit beträgt 19 Stunden. Als Sprühmittel verwenden wir Anilinphthalat (47).

Zur quantitativen Bestimmung der Glucose verwenden wir den Enzymtest der Firma Boehringer. Dieser beruht darauf, daß das Enzym Glucoseoxydase die Oxydation der in der Untersuchungslösung enthaltenen Glucose zu Gluconsäure katalysiert, wobei H_2O_2 entsteht. Dieses oxydiert unter enzymatischer Katalyse durch Peroxydase einen Wasserstoffdonator (z.B. o-Dianisidin), der dabei in einen

Tabelle 28

R_F-Werte der untersuchten Zucker in System V: wassergesättigtes Phenol und System VI: Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5).

Substanz	R_F-Werte in System V	R_F-Werte in System VI
Glucose	0,36	0,18
Galaktose	0,41	0,17
Ribose	0,58	0,30
Acetylglucosamin	0,67	0,25

rotbraunen Farbstoff übergeht. Der Farbstoff wird bei 436 mμ gemessen. Die Extinktionsdifferenz zwischen der Untersuchungslösung und einer Standardlösung entspricht dem Glucosegehalt.

Den Gehalt an Galaktose in der Untersuchungslösung ermittelt man durch die Methode von H. Koehler (30): Zu 2,5 ml der vorsichtig hydrolysierten Substanzlösung gibt man 5 ml einer 0,2%igen Anthronlösung in 95%iger Schwefelsäure. Dabei wird das Reagenzglas in kaltem Wasser geschüttelt. Dann wird es zugeschmolzen und in einem Wasserbad erhitzt. Es entsteht eine grasgrüne Farbe, die für Galaktose ihr Maximum nach 6 Minuten und für Glucose nach 11 min. Erhitzen erreicht. Nach dem Abkühlen in kaltem Wasser wird die Farbintensität unter Verwendung eines Rotfilters im Kolorimeter gemessen. Als Vergleichslösung dient eine Mischung aus 5 ml Reagenz und 2,5 ml Wasser. Vom Hexosegehalt, der sich nach 11 Minuten langem Erhitzen aus der Farbintensität berechnen läßt, zieht man die oben ermittelte Menge Glucose ab und erhält so den Gehalt an Galaktose.

3) UDPA

Nach Hydrolyse mit 0,01n HCl (7) wird das freigesetzte Acetylglucosamin papierchromatographisch im System V oder VI abge-

trennt und mit dem von S.M. Patridge (46) angegebenen Sprühmittel lokalisiert.

W.T.I. Morgan und L.A. Elson (39) haben ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung angegeben: 1 ml der hydrolysierten Untersuchungslösung versetzt man mit 0,1 ml einer 0,5n Natriumkarbonatlösung und erhitzt 5 Minuten im siedenden Wasserbad. Nach dem Abkühlen ergänzt man mit Eisessig auf 2 ml. Darauf fügt man 1 ml Reagenzlösung zu, die durch Auflösen von 2 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 95 ml Eisessig und 5 ml conc. HCl bereitet worden ist. Schließlich wird mit Eisessig auf 10 ml verdünnt und nach 45 Minuten die Absorption der roten Lösung kolorimetrisch gemessen.

Als Standard dient eine 0,1%ige Lösung von N-Acetylglucosamin. Dazu löst man 1 g N-Acetylglucosamin in 10 ml mit Chloroform gesättigtem Wasser und füllt mit Aqua dest. auf 1000 ml auf.

4) UDPGl

Durch vorsichtige Hydrolyse (0,01n HCl, 100°, 5 Minuten) (7) entsteht neben UDP freie Glucuronsäure.

Zu 0,8 ml der Analysensubstanz gibt man 0,2 ml einer 0,2%igen Mannoselösung. Dann läßt man unter Schütteln in Eiswasser 4,5 ml einer Mischung aus 6 Volumen-Teilen 98%iger Schwefelsäure und 1 Volumen-Teil Wasser zufließen. Nun wird die Mischung 3 Minuten in siedendem Wasserbad erhitzt, abgekühlt und schließlich mit 0,1 ml einer 2,5%igen Thioglykolsäurelösung versetzt. Nach 24 Stunden entwickelt sich eine tiefe rosa Farbe, deren Absorption im Spektralphotometer bei 540 mμ gemessen wird (17).

Eine 0,02%ige Glucuronsäurelösung verwenden wir als Standard.

Die auftretende Färbung setzt sich aus 2 getrennten Reaktionen zusammen: Glucuronsäure + Thioglykolsäure = braun und Mannose + Glucuronsäure + Thioglykolsäure = rosa.

E. Zusammenfassung

Es wird der Gehalt an säurelöslichen Nukleotiden der Rattenleber im Normalzustand, im Verlauf von Regenerationsvorgängen nach partieller Hepatektomie und in verschiedenen Zeitabständen nach Fütterung mit Buttergelb bestimmt. Qualitative Unterschiede treten dabei nicht auf. In quantitativer Hinsicht lassen sich aber bei den verschiedenen Funktionszuständen der Rattenleber charakteristische Veränderungen nachweisen.

Bei der regenerierenden Leber zeigt sich im Bereich der Uracilnukleotide UMP, UDP, UDPA und UDPGl eine gewaltige Vermehrung, die auf eine Steigerung der Mucopolysaccharidsynthese und auf erhöhte Glucuronidbildung schließen läßt. Die signifikante Zunahme des Gehaltes an CMP weist auf einen vermehrten Lipoidstoffwechsel hin. IMP ist signifikant verringert, was mit der gleichzeitigen Abnahme des Gehaltes der Adenosinphosphatsumme in Einklang steht. Darüber hinaus ist auch die Abnahme von DPN, TPN und ADPRP im regenerierenden Gewebe beachtenswert.

Ähnliche Veränderungen wie bei dem regenerierenden Organ finden sich auch bei der durch Buttergelb geschädigten Leber. Eine Kontinuität im Verlauf der Fütterung von p-Dimethylaminoazobenzol kann nicht gefunden werden. Die stärkste Abweichung vom Normalgehalt tritt nach 60- und 100tägiger Schädigung auf. Wie bei der regenerierenden Leber ist auch in dem mit Buttergelb behandelten Organ der Gehalt aller Uracilnukleotide mit Ausnahme von UDPG + UDPGa stark vermehrt. Auch CMP erfährt in allen Versuchsreihen einen charakteristischen Anstieg. Im Gegensatz zum regenerierenden Gewebe ist bei der geschädigten Leber der Gehalt an IMP beachtlich erhöht. Der prozentuale Anteil von DPN, TPN und ADPR an der Gesamtextinktion aller Nukleotide der "präcancerogenen" Rattenleber liegt schon nach 60tägiger Einwirkungsdauer des Cancerogens stark unter der Norm. Nach 150 Tagen findet jedoch bei DPN und ADPR eine Vermehrung über den Gehalt im normalen Gewebe statt. Die Summe der Adenosinphosphate ist wie beim regenerierenden Organ geringer als im unbehandelten.

Abkürzungen

E	=	Extinktion
M	=	Mol
R	=	Rechromatogramm
DAB	=	4-Dimethylaminoazobenzol
AMP	=	Adenosin-5'-monophosphat
ADP	=	Adenosin-5'-diphosphat
ADP-2'-5'	=	Adenosin-2'-monophosphat-5'-monophosphat
ADPR	=	Adenosin-5'-diphosphatribose
ADPRP	=	Adenosin-2'-monophosphat-5'-diphosphatribose
ATP	=	Adenosin-5'-triphosphat
GMP	=	Guanosin-5'-monophosphat
GDP	=	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	=	Guanosin-5'-triphosphat
CMP	=	Cytidin-5'-monophosphat
CDP	=	Cytidin-5'-diphosphat
CTP	=	Cytidin-5'-triphosphat
UMP	=	Uridin-5'-monophosphat
UDP	=	Uridin-5'-diphosphat
UDPA	=	Uridin-5'-diphosphat-N-acetylglucosamin
UDPG	=	Uridin-5'-diphosphat-glucose
UDPGa	=	Uridin-5'-diphosphat-galaktose
UDPGl	=	Uridin-5'-diphosphat-glucuronsäure
UTP	=	Uridin-5'-triphosphat
DPN	=	oxyd. Diphosphopyridinnukleotid } Codehydrase I
DPNH	=	reduz. Diphosphopyridinnukleotid } Codehydrase I
TPN	=	oxyd. Triphosphopyridinnukleotid } Codehydrase II
TPNH	=	reduz. Triphosphopyridinnukleotid } Codehydrase II
IMP	=	Inosin-5'-monophosphat
HS	=	Harnsäure
RNS	=	Ribonukleinsäure

Literaturverzeichnis

1) R. Abrahams und M. Bentley, J. Amer. chem. Soc. 77, 4179 (1955)

2) C.P. Barnum, C.W. Nash, E. Jennings, O. Nygard und H. Vermund, Arch. Biochemistry 25, 376 (1950)

3) G.H. Beaven, E.H. Holiday und E.A. Johnson, Optical properties of nucleic acids and their compounds. - aus E. Chargaff und I.N. Davidson: "Nucleic acids", Vol. 1 S. 493 Acad. Press. Inc. Publ. New York 1955

4) F. Bernheim und A.V. Felsovanyi, Science 91, 76 (1940)

5) M.V. Branster und R.K. Morton, Biochem. J. 63, 640 (1956)

6) E. Cabib, L.F. LeLoir und C.E. Cardini, J. biol. Chem. 203, 1055 (1953)

7) R. Caputto, L.F. LeLoir, C.E. Cardini und A.C. Paladini, J. biol. Chem. 184, 333 (1950)

8) C. Carruthers und V. Suntzeff, Arch. Biochem. Biophysics 45, 140 (1953)

9) E. Chargaff, B. Magasanik, E. Vischer, Ch. Green, R. Doniger und D. Elson, J. biol. Chem. 186, 51 (1950)

10) W.E. Cohn, J. Amer. chem. Soc. 72, 1471 (1950)

11) W.E. Cohn, Science 109, 377 (1949)

12) W.E. Cohn und C.E. Carter, J. Amer. chem. Soc. 72, 4273 (1950)

13) S.P. Colowick, N.O. Kaplan und M.M. Ciotti, J. biol. Chem. 191, 447 (1951)

14) H. Coper, H. Herken und W. Koranskj, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exptl. Pathol. Pharmakol. 234, 455 (1958)

15) R. Daoust und A. Cantero, Cancer Res. 15, 734 (1955)

16) A. Deutsch und R. Nilsson, Acta chem. scand. 7, 1288 (1953)

17) Z. Dische, J. biol. Chem. 171, 725 (1947)

18) G.I. Dutton und I.D.E. Storey, Biochem. J. 53, XXXVII (1953); 57, 275 (1954)

19) H. Gärtner, Dissert. Berlin (1960)

20) G.E. Glock und P. McLean, Biochem. J. 65, 413 (1957)

21) A. Graffi, E.J. Schneider, G. Sydow und L. Kügler, Arch. Geschwulstforsch. 5, 14 (1953)

22) H.J. Hohorst, F.H. Kreutz und Th. Bücher, Biochem. Z. 332, 18 (1959)

23) R.B. Hurlbert und V.R. Potter, J. biol. Chem. 209, 1 (1954)

24) R.B. Hurlbert, H. Schmitz, A.F. Brumm und V.R. Potter, J. biol. Chem. 209, 23 (1954)

25) L.A. Jedeikin und S. Weinhouse, J. biol. Chem. 213, 271 (1955)

26) E.P. Kennedy, J. biol. Chem. 222, 185 (1956)

27) E.P. Kennedy und S.B. Weiss, J. Amer. chem. Soc. 77, 250 (1955)

28) E.P. Kennedy und S.B. Weiss, J. biol. Chem. 222, 193 (1956)

29) C.J. Kensler, K. Suguira und C.P. Rhoads, Science 91, 623 (1940)

30) H. Koehler, Analytic. Chem. 24, 1576 (1952)

31) W. Koranskj, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exptl. Pathol. Pharmakol. 234, 46 (1958)

32) J. Liebermann, J. biol. Chem. 222, 765 (1956)

33) J. Liebermann, J. biol. Chem. 223, 327 (1956)

34) S.H. Lipton, S.A. Morell, A. Frieden und R. Bock, J. Amer. chem. Soc. 75, 5449 (1953)

35) R. Markham und I.D. Smith, Biochem. J. 45, 294 (1949)

36) A. Marshak und H.I. Vogel, J. biol. Chem. 189, 597 (1951)

37) W. Mejbaum, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 258, 117 (1939)

38) G. Michal und W. Lamprecht, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 324, 170 (1961)

39) W.T.I. Morgan und L.A. Elson, Biochem. J. 28, 988 (1934)

40) I.W. Orr und D.E. Price, J. Pathol. Bacteriol. 60, 461 (1948)

41) I.W. Orr und D.E. Price, J. Pathol. Bacteriol. 60, 573 (1948)

42) Pabst Laboratories Milwaukee 5, Circular OR-7 (1955)

43) K. Papenberg, M. Klingenberg und H.W. Heldt, 11. Colloquium der Gesellschaft f. physiolog. Chemie, Heidelberg, Springer, S. 25 (1961)

44) K. Papenberg, Klin. Wschr. 39, 522 (1961)

45) K. Papenberg, Klin. Wschr. 39, 739 (1961)

46) S.M. Patridge, Biochem. J. 42, 238 (1948)

47) S.M. Patridge, Nature (London) 164, 443 (1949)

48) E. Reid und F. Lotz, Brit. J. Cancer 12, 419 (1958)

49) E. Reid und B.M. Stevens, Biochem. J. 67, 262 (1957)

50) I.I. Saukkonen, Ann. Med. exptl. Biol. fenn. 34 (Suppl. Nr. III), 1 (1956)

51) I.I. Saukkonen, Dissert. Helsinki 1956

52) H. Schmitz, Biochem. Z. 325, 555 (1954)

53) H. Schmitz, Habilitationsschrift Heidelberg (1954)

54) H. Schmitz, 11. Colloquium der Gesellschaft f. physiolog. Chemie, Heidelberg, Springer S. 1 (1961)

55) H. Schmitz, R.B. Hurlbert und V.R. Potter, J. biol. Chem. 209, 41 (1954)

56) H. Schmitz, V.R. Potter, R.B. Hurlbert und D.M. White, Cancer Res. 14, 66 (1954)

57) H. Schmitz und G. Walpurger, Angew. Chemie 71, 549 (1959)

58) H. Schnitger, K. Papenberg, E. Ganse, R. Czok, Th. Bücher und H. Adam, Biochem. Z. 332, 167 (1959)

59) K. Schriever, E. Bamann und R. Toussaint, Dtsch. Apoth.-Ztg. 97, 889 (1957)

60) D. Smith und R. Markham, Biochem. J. 46, 509 (1950)

61) J.D. Spain und A.C. Griffin, Cancer Res. 17, 200 (1957)

62) J.D.E. Storey und G.J. Dutton, Biochem. J. 59, 279 (1955)

63) L. Strominger, Angew. Chemie 74, 194 (1962)

64) W. Thorn, J. Heimann, G. Gercken und B. Müldener, Z. ges. exptl. Med. 130, 497 (1958)

65) S.B. Weiss, Nature 178, 594 (1956)

66) A. Wollenberger, O. Ristau und G. Schoffa, Pflügers Arch. ges. Physiol. 270, 399 (1960)

67) G.R. Wyatt, Biochem J. 48, 584 (1951)

Lebenslauf

Am 7. Mai 1936 wurde ich als Sohn des Apothekers Luitpold Lang und seiner Ehefrau Anna, geb. Stadler, in Mindelheim geboren.

An den Besuch der Volksschule meiner Vaterstadt in den Jahren 1942 - 1946 schloß sich ein achtjähriges Studium an der Oberschule der Maristenschulbrüder in Mindelheim an, das ich mit Ablegen der Reifeprüfung im Juli 1954 beendete.

Am 1. Oktober 1954 begann meine zweijährige Praktikantenzeit in der Hubertus-Apotheke in Kochel/Obb., die mit dem pharmazeutischen Vorexamen ihren Abschluß fand.

Im Wintersemester 1956 habe ich mit dem Studium der Pharmazie an der Universität München begonnen und mich dort im November 1959 dem pharmazeutischen Staatsexamen unterzogen.

Seit Januar 1960 beschäftigte ich mich mit der vorliegenden Promotionsarbeit.